

**Die Bedeutung der  
Vitamin D - Vitamin D-Rezeptor-Achse  
in der Aktivierung der humanen hepatischen  
Sternzellen**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Anja Beilfuß-Zahn

aus Köthen

Oktober 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt, eine Einrichtung der Universität Duisburg Essen.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ali Canbay
2. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses Prof. Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2015

## Inhaltsverzeichnis

1	Einführung .....	1
1.1	Leber .....	1
1.2	Hepatische Sternzellen .....	3
1.3	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.....	6
1.4	NAFLD, Fibrose und HSC-Aktivierung.....	8
1.5	Hepatische Fibrose .....	9
1.6	Therapie der NAFLD und der resultierenden Fibrose .....	11
1.7	NAFLD und Vitamin D .....	12
1.8	Vitamin D .....	13
1.9	Vitamin D-Wirkungen.....	16
1.10	VDR, Signalweg und einzelne Nukleotid Polymorphismen (SNP) .....	18
1.10.1	VDR .....	18
1.10.2	VDR-Signalweg .....	19
1.10.3	VDR-SNPs.....	20
1.11	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Material .....	24
2.1.1	Patientenmaterial.....	24
2.1.2	Substanzen und Chemikalien .....	24
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.4	Geräte.....	30
2.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze.....	31
2.1.5.1	Zusammensetzung HSC-Wachstumsmedium .....	31
2.1.5.2	Zusammensetzung Hepatozyten-Zellkulturmedium.....	32
2.1.5.3	Zusammensetzung Kupffer-Zell-Wachstumsmedium .....	32
2.1.5.4	Zusammensetzung Endothelzell-Wachstumsmedium .....	32

2.1.6	Antikörper .....	32
2.1.6.1	Primärantikörper für Western Blots.....	32
2.1.6.2	Primärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse.....	33
2.1.6.3	Sekundärantikörper .....	34
2.1.7	Enzyme.....	34
2.1.8	Oligonukleotide für die PCR .....	35
2.1.9	Kits.....	36
2.1.10	Pufferzusammensetzungen .....	36
2.1.10.1	1x RIPA-Gebrauchspuffer.....	36
2.1.10.2	1x MES-Laufpuffer.....	37
2.1.10.3	Tris-buffered Saline (TBS) .....	37
2.1.10.4	TBS plus Tween 20 (TBST) .....	37
2.1.10.5	5 % BSA-Blockierlösung.....	37
2.1.10.6	5 % Milch-Blockierlösung.....	37
2.1.10.7	Stripping-Puffer.....	37
2.1.10.8	Transferpuffer für Western-Blot .....	37
2.1.10.9	Natriumcitrat-Puffer.....	37
2.1.10.10	Nile Red-Färbelösung.....	37
2.1.10.11	Coomassie-Färbelösung.....	38
2.1.10.12	Coomassie-Entfärber .....	38
2.1.10.13	Ponceau S-Färbelösung .....	38
2.1.10.14	Sirius Red-Färbelösung .....	38
2.1.10.15	TGF- $\beta$ -Stammlösung .....	38
2.1.10.16	HBSS/Genta/Hepes.....	38
2.1.10.17	HBSS/Genta/Hepes mit EGTA .....	38
2.1.10.18	HBSS/Genta/Hepes mit $\text{CaCl}_2$ .....	38
2.1.10.19	Kollagenase-Perfusionslösung .....	38
2.1.11	Software .....	39

2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Zellisolation.....	39
2.2.1.1	Isolation humaner primärer Hepatozyten.....	40
2.2.1.2	Isolation primärer nicht-parenchymaler Leberzellen .....	41
2.2.1.2.1	MACS-Isolation primärer humaner hepatischer Sternzellen .....	42
2.2.1.2.2	Isolation primärer humaner Kupffer-Zellen und Endothelzellen .....	43
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl .....	43
2.2.3	Auftauen und Kultivierung kommerziell erworbener primärer humaner hepatischer Sternzellen (khHSC).....	44
2.2.4	Kultivierung der isolierten primären hepatischen Sternzellen .....	44
2.2.5	Einfrieren und Auftauen der isolierten pHSC .....	45
2.2.6	Behandlungsstrategien mit unterschiedlichen Substanzen.....	45
2.2.6.1	<i>In vitro</i> -Behandlung primärer hepatischen Sternzellen mit freien Fettsäuren und Vitamin D <sub>2</sub> .....	46
2.2.6.2	<i>In vitro</i> -Behandlung primärer hepatischen Sternzellen mit TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> . 46	
2.2.6.3	<i>In vitro</i> -Behandlung der pHSC mit TGF- $\beta$ und TGF- $\beta$ -Rezeptor-Kinase-Inhibitor für 24 h.....	47
2.2.6.4	Transiente Transfektion von pHSC mit VDR-siRNA und Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> für 24 h .....	47
2.2.6.5	Behandlung der pHSC mit TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> für 15-60 min .....	49
2.2.6.6	Behandlung der pHSC mit TGF- $\beta$ und 30-minütiger VD <sub>2</sub> -Vorinkubation für 15-60 min.....	49
2.2.7	Vitamin D-Rezeptor-Degradation.....	49
2.2.8	Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	49
2.2.8.1	RNA-Isolation aus Zellkulturen .....	49
2.2.8.2	RNA-Isolation aus Lebergewebe .....	50
2.2.8.3	RNA-Quantifizierung.....	51
2.2.8.4	Reverse Transkription der RNA in cDNA .....	51
2.2.8.5	Quantitative RT-PCR .....	51

2.2.8.6	Primerdesign.....	52
2.2.8.6.1	Durchführung der quantitativen RT-PCR .....	52
2.2.8.6.2	Auswertung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	54
2.2.9	Proteinisolation und -nachweis .....	54
2.2.9.1	Herstellung von Gesamtprotein-Zelllysates .....	54
2.2.9.2	Fraktionierte Proteinisolation aus Zytosol und Nukleus .....	54
2.2.9.3	Isolation von Proteinlysaten aus Lebergewebe .....	55
2.2.9.4	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	55
2.2.9.5	Western-Blot (Immunoblotting) .....	55
2.2.9.5.1	Elektrophoretische Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamid Gel.....	56
2.2.9.5.2	Nasstransfer der Proteine auf PVDF-Membranen („Blotting“) und Nachweis ..	56
2.2.9.5.3	Immunologischer Proteinnachweis .....	57
2.2.9.5.4	Entfernung der gebundenen Antikörper .....	59
2.2.9.5.5	Anfärbung des SDS-PAGE-Gels mit Coomassie.....	59
2.2.10	Bestimmung der Serumparameter ALT, AST und FFA.....	59
2.2.11	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) .....	59
2.2.12	Histologische Nachweismethoden .....	60
2.2.12.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	60
2.2.12.2	Nile Red-Färbung an pHSC .....	60
2.2.12.3	Sirius Red-Färbung.....	61
2.2.12.4	Immunfluoreszenzfärbungen .....	61
2.2.12.4.1	Direkte $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenzfärbung im Lebergewebe.....	61
2.2.12.4.2	Identifikation der isolierten pHSC mittels Immunfluoreszenz .....	62
2.2.13	Nachweis von Einzelnukleotid-Polymorphismen.....	63
2.2.13.1	Genomische DNA-Präparation .....	63
2.2.13.2	PCR VDR-SNPs .....	63
2.2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	65
2.2.13.4	Restriktionsverdau zur SNP-Analyse.....	66

2.2.14	Statistik .....	67
3	Ergebnisse.....	68
3.1	<i>Ex vivo</i> -Analysen von Seren und Leberbiopsien von NAFLD-Patienten.....	68
3.1.1	Charakterisierung und Serologie von NAFLD-Patienten.....	68
3.1.2	Analyse der VDR-Expression in NAFLD-Patienten.....	71
3.1.3	Expressionsanalyse der Strukturproteine Col1 $\alpha$ und $\alpha$ -SMA in NAFLD-Patienten .....	73
3.1.4	Untersuchung der TGF- $\beta$ -Expression in NAFLD-Patienten .....	76
3.2	<i>In vitro</i> -Experimente an isolierten primären hepatischen Sternzellen .....	77
3.2.1	Nachweis der Isolation humaner primärer hepatischer Sternzellen.....	78
3.2.2	Nachweis der Aufnahme und Hydroxylierung von VD <sub>2</sub> .....	79
3.2.3	Behandlung der pHSC mit freien Fettsäuren zur Simulation steatotischer Bedingungen in der Leber .....	81
3.2.3.1	Aufnahme freier Fettsäuren in behandelten pHSC nach 24 Stunden ....	82
3.2.3.2	Effekte der VD <sub>2</sub> - und FFA-Behandlung auf Fibrose, Inflammation und VDR-Expression in isolierten pHSC.....	82
3.2.3.2.1	VDR-Expression in isolierten pHSC nach 24- und 48-stündiger Behandlung mit FFA und VD <sub>2</sub> .....	83
3.2.3.2.2	Expression von Strukturproteinen in pHSC nach Behandlung mit FFA und VD <sub>2</sub> .....	84
3.2.3.2.3	Zytokinexpression in isolierten pHSC nach Behandlung mit VD <sub>2</sub> und FFA .....	86
3.2.4	Behandlungen isolierter pHSC mit TGF- $\beta$ zur Simulation fibrotischer Bedingungen in der Leber .....	89
3.2.4.1	Auswirkungen der TGF- $\beta$ -Stimulation auf die mRNA-Expression Fibrose relevanter Marker in pHSC .....	89
3.2.4.2	Vitamin D-Wirkungen in TGF- $\beta$ vorstimulierten pHSC .....	91
3.2.4.2.1	Auswirkungen von TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> auf die VDR-Expression in pHSC ..	92
3.2.4.2.2	VD <sub>2</sub> -Wirkung auf die Strukturproteinexpression von $\alpha$ -SMA in pHSC....	94
3.2.4.2.3	Wirkungen von TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> auf die Expression von Col1 $\alpha$ in pHSC	97

3.2.4.2.4	VD <sub>2</sub> - und TGF- $\beta$ -Wirkung auf das endogene Zytokin TGF- $\beta$ in pHSC.	100
3.2.4.2.5	VD <sub>2</sub> - und TGF- $\beta$ -Wirkung auf die PDGF-Expression in pHSC.....	103
3.2.4.2.6	VD <sub>2</sub> - und TGF- $\beta$ -Wirkung auf die Fibronectin-Expression in pHSC.....	105
3.3	Expression von TGF- $\beta$ , $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$ und des TGF- $\beta$ -Signalwegsmoleküls Smad2 in pHSC nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und einem TGF- $\beta$ -Rezeptor-Inhibitor nach 24 h .....	107
3.3.1.1.1	Einfluss von TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> auf die Phosphorylierung des Smad-Signalwegsmediators Smad2 in pHSC.....	110
3.3.1.2	TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Wirkungen auf die zellkompartimentenabhängigen Expressionen von VDR und Smad-Mediatoren .....	112
3.4	Einfluss von VDR in der Progression der Leberfibrose in TGF- $\beta$ behandelten primären humanen hepatischen Sternzellen.....	115
3.4.1	VDR-siRNA-Transfektion in humanen hepatischen Sternzellen .....	115
3.4.2	Optimierung des VDR-Knock-downs in kommerziellen humanen HSC mittels VDR-siRNA .....	115
3.4.3	Expression von VDR und Fibrose-assoziiierter Moleküle nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> in pHSC mit siRNA abhängigem VDR-Knock-down .....	117
3.4.3.1	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die VDR-Expression in pHSC.....	117
3.4.3.2	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die $\alpha$ -SMA-Expression in pHSC .....	119
3.4.3.3	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die Col1 $\alpha$ -Expression in pHSC .....	121
3.4.3.4	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die TGF- $\beta$ -Expression in pHSC .....	123
3.4.3.5	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die PDGF-Genexpression in pHSC .....	125
3.4.3.6	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die FN-Genexpression in pHSC .....	126



3.4.4	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkungen von VD <sub>2</sub> und VDR auf die Expression Smad-Signalweg-abhängiger Mediatoren sowie des Erk-Signalmoleküls in pHSC .....	127
3.5	VDR-Degradation in Abhängigkeit von VD <sub>2</sub> in pHSC .....	132
3.6	Untersuchung der Expression verschiedener Signalwege nach gleichzeitiger Behandlung mit TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> in pHSC für 15 – 60 min.....	133
3.7	Expression von Smad2 nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und 30-minütiger VD <sub>2</sub> -Vorinkubation in pHSC für 15 – 60 min .....	137
3.8	Vitamin D-Rezeptor-SNP .....	139
4	Diskussion .....	145
4.1	Hintergründe und Zusammenhänge .....	145
4.2	Auswirkungen des NAFLD-Schweregrades auf den Vitamin D-Status und die Expression von VDR im Lebergewebe .....	146
4.3	Auswirkungen einer FFA- und VD <sub>2</sub> -Behandlung auf die Expression Fibrose-relevanter Marker in isolierten pHSC .....	148
4.4	Auswirkungen von TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> auf die Expression von VDR und Fibrose-relevante Marker in pHSC .....	153
4.5	Auswirkungen einer VDR-Expressionsinhibition auf die Expression Fibrose-relevanter Faktoren in pHSC .....	157
4.6	Nicht-genomische Auswirkungen einer VD <sub>2</sub> -Behandlung in TGF- $\beta$ -stimulierten WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC.....	159
4.7	Auswirkungen der VDR-SNP auf das Expressionsverhalten Fibrose-relevanter Marker in pHSC .....	160
4.8	Limitationen der <i>in-vitro</i> -Studie .....	161
4.9	Ausblick .....	162
5	Zusammenfassung .....	164
6	Literatur .....	167
7	Danksagungen .....	184
8	Lebenslauf .....	185
9	Sonstiges .....	189

## Abkürzungsverzeichnis

1,25-VD	1,25-Dihydroxyvitamin D
1,25-VD MARRS	<i>1,25-VD membran-associated rapid-response steroid-binding protein</i>
25-VD	25-Hydroxyvitamin D
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
A	Adenosin
Aa.	Arteriae
AF2	Aktivierungsfunktion 2
ALT	Alanin-Aminotransferase
ApoB	Apolipoprotein B
AST	Aspartat-Aminotransferase
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CBP/P300	<i>CREB1-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Col1α	Kollagen Typ I
ct	<i>cycle threshold</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CXCR3	<i>CXC-motiv chemokine receptor 3</i>
CYP	Cytochrom P <sub>450</sub>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>electrogenerated chemoluminescence</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> = extrazelluläre Matrix

EDTA	Etylendiaminotetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol <i>bis</i> (2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetat
EIA	<i>enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FFA	<i>free fatty acids</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FN	Fibronektin
FOXO 1	<i>Forkhead box protein O 1</i>
G	Guanin
g	Schwerkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	<i>Gey's Balanced Salt Solution</i>
Gc-Globulin	<i>group-specific component globulin</i>
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
khHSC	kommerziell erworbene humane hepatische Sternzellen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase

HSC	<i>hepatic stellate cells</i> = hepatischen Sternzellen
HSP90	<i>heat shock protein 90kDa</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KC	Kupffer-Zellen
Ko	Kontrolle
Koreg.	koregulatorisch
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
LTx	Lebertransplantationen
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Seperation</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
min	Minuten
MMP	Matrix Metalloproteasen
MPS	Mononukleären Phagozytensystem
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Stichprobenumfänge
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanat
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NAFLE	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NcoR	<i>nuclear receptor co-repressor</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ns siRNA	<i>non silencing siRNA</i>
PBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDIA3	<i>Protein disulfide isomerase family A, member 3</i>
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
phHSC	<i>primary human hepatic stellate cells</i>
PI3	Phosphatidylinositol 3

pMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pSmad	phospho Smad
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> PCR
RAC3	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3</i>
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RES	Retikuloendotheliales System
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> Puffer
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X-Rezeptor
SCR1	<i>steroid receptor coactivator-1</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smad	<i>homolog of mothers against decapentaplegic drosophila</i>
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid or thyroid hormone receptors</i>
Smurf2	<i>SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	<i>Thymin</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TBP	<i>TATA Box binding protein</i>
TBS (T)	<i>Tris-buffered Saline (Tween)</i>
TEK2	<i>tyrosin kinase endothelial 2</i>
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIK	Transkriptions-Initiations-Komplex
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
tlw.	teilweise
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TR	Transfektionsreagenz
UTR	<i>untranslated region</i>

UV	Ultraviolett
VD	Vitamin D
VDR	VD-Rezeptor
VDRE	<i>vitamin D response elements</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vf	Verdünnungsfaktor
Vv.	Venae
WT	Wildtyp
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Leber mit ihrer funktionellen Einheit.	2
Abbildung 2:	Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen.	6
Abbildung 3:	Potentielle Quellen hepatischer Myofibroblasten.	10
Abbildung 4:	VDR-Signalweg.	20
Abbildung 5:	VDR-Struktur mit den einzelnen SNP.	21
Abbildung 6:	Dichtezentrifugation zur Zellisolation.	42
Abbildung 7:	Bestückung der Blot-Kassette.	57
Abbildung 8:	Serumkonzentrationen von MCP-1 und Rantes in NAFLD-Patienten und Kontrollen.	70
Abbildung 9:	Serumkonzentrationen von FFA und 25-Hydroxyvitamin D in NAFLD- Patienten und Kontrollen.	71
Abbildung 10:	Hepatische VDR-Expression in NAFLD-Patienten und Kontrollen.	72
Abbildung 11:	Hepatische Expression von $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$ in NAFLD-Patienten und Kontrollen.	74
Abbildung 12:	Histologische und immunhistochemische Darstellung der hepatischen Expression von Kollagen und $\alpha$ -SMA in NAFLD-Patienten und Kontrolle.	75
Abbildung 13:	TGF- $\beta$ -Expression in NAFLD-Patienten und Kontrollen.	76
Abbildung 14:	Verifizierung der pHSC mit zellspezifischen Markern.	78
Abbildung 15:	Nachweis der pHSC-Reinheit mittels Immunzytochemie.	79
Abbildung 16:	Metabolisierung von VD <sub>2</sub> zu 25-Hydroxyvitamin D <sub>2</sub> .	80
Abbildung 17:	mRNA-Expression von CYP2R1 und CYP27B1 in pHSCs.	81
Abbildung 18:	Mikroskopische Darstellung der Aufnahme von FFA in pHSC.	82

Abbildung 19:	VDR-Expression in FFA- und VD <sub>2</sub> -behandelten pHSC nach 24 und 48 h.	83
Abbildung 20:	Expressionsänderung der Strukturproteine in pHSC nach 24 und 48 h Behandlung.	85
Abbildung 21:	Expressionsänderungen der Zytokine TGF- $\beta$ und MCP-1 in FFA- und VD <sub>2</sub> -behandelten pHSC nach 24 h und 48 h.	87
Abbildung 22:	TGF- $\beta$ -Konzentrationswirkungskurven in khHSC.	90
Abbildung 23:	Virus-abhängige Streuungen der $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression in pHSCs bei der Behandlung mit VD <sub>2</sub> und/oder TGF- $\beta$ nach 24 h.	91
Abbildung 24:	Virus-abhängige VDR-Expression in pHSC.	93
Abbildung 25:	Detektion der VDR-Expression mittels Western-Blot.	94
Abbildung 26:	Virus-abhängige $\alpha$ -SMA-Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	96
Abbildung 27:	Detektion der $\alpha$ -SMA-Expression in Virus-unbelasteten pHSC mittels Western-Blot.	97
Abbildung 28:	Virus-abhängige Expression von Col1 $\alpha$ in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	99
Abbildung 29:	Detektion der Col1 $\alpha$ -Expression in Virus-unbelasteten pHSC.	100
Abbildung 30:	Virus-abhängige Expression von TGF- $\beta$ in pHSC nach TGF- $\beta$ und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	102
Abbildung 31:	Detektion der TGF- $\beta$ -Expression in Virus-unbelasteten pHSC mittels Western-Blot.	103
Abbildung 32:	Virus-abhängige Expression von PDGF in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	104
Abbildung 33:	Virus-abhängige Expression von Fibronektin in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	106
Abbildung 34:	Inhibition der Expression von VDR und TGF- $\beta$ durch LY-364947 in pHSC.	108
Abbildung 35:	Inhibition der Expression von $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$ durch LY-364947 in pHSC.	109
Abbildung 36:	Inhibition der Expression von pSmad2 und Smad2 durch LY-364947 in pHSC.	110
Abbildung 37:	Virus-abhängige Expression von pSmad2 und Smad2 in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	111

Abbildung 38:	Detektion der Expressionen von pSmad2 und Smad2 in Virus-unbelasteten pHSC.	112
Abbildung 39:	Zellkompartiment-abhängige VDR-Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	113
Abbildung 40:	Zellkompartiment-abhängige Aktivierung des Smad-Signalweges in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	114
Abbildung 41:	Konzentrationsabhängige Reduktion der VDR-Genexpression in khSC durch VDR-siRNA nach 24 h.	116
Abbildung 42:	VDR-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration an TR.	116
Abbildung 43:	VDR-Expression in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC.	118
Abbildung 44:	$\alpha$ -SMA-Expression in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC.	120
Abbildung 45:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Col1 $\alpha$ -Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	122
Abbildung 46:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige TGF- $\beta$ -Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	124
Abbildung 47:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige PDGF-Genexpression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und/oder VD <sub>2</sub> -Behandlung.	125
Abbildung 48:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige FN-Genexpression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	126
Abbildung 49:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Expression der Mediatoren Smad2 und pSmad2 in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	128
Abbildung 50:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Expression von Smad7 und Smurf2 in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	130
Abbildung 51:	VDR-siRNA-transfektionsabhängige Expression von Erk und pErk in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD <sub>2</sub> -Behandlung.	132
Abbildung 52:	VDR-Degradation in pHSC.	133
Abbildung 53:	Zeitabhängige Beeinflussung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges durch VD <sub>2</sub> in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation.	134
Abbildung 54:	Zeitabhängige Beeinflussung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg-Mediators Smad4 durch VD <sub>2</sub> in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation.	136
Abbildung 55:	Zeitabhängige Beeinflussung von Smad7 und Smurf2 durch VD <sub>2</sub> in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation.	137



Abbildung 56:	Zeitabhängige Beeinflussung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges durch eine VD <sub>2</sub> -Vorinkubation in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation.	138
Abbildung 57:	VDR-Genotypverteilung in der pHSC- und Kontrollgruppe.	140
Abbildung 58:	Proteinexpression von Col1 $\alpha$ in Abhängigkeit des G-1520C Genotyps.	141
Abbildung 59:	Proteinexpression von $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$ in Abhängigkeit des Bsml Genotyps.	141
Abbildung 60:	Proteinexpression von VDR und TGF- $\beta$ in Abhängigkeit vom Ddel Genotyp.	142
Abbildung 61:	Proteinexpression von $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$ in Abhängigkeit vom Ddel Genotyp.	143
Abbildung 62:	Proteinexpression von Col1 $\alpha$ in Abhängigkeit des Taq <sup>a</sup> I Genotyps.	144

## Tabellenverzeichnis

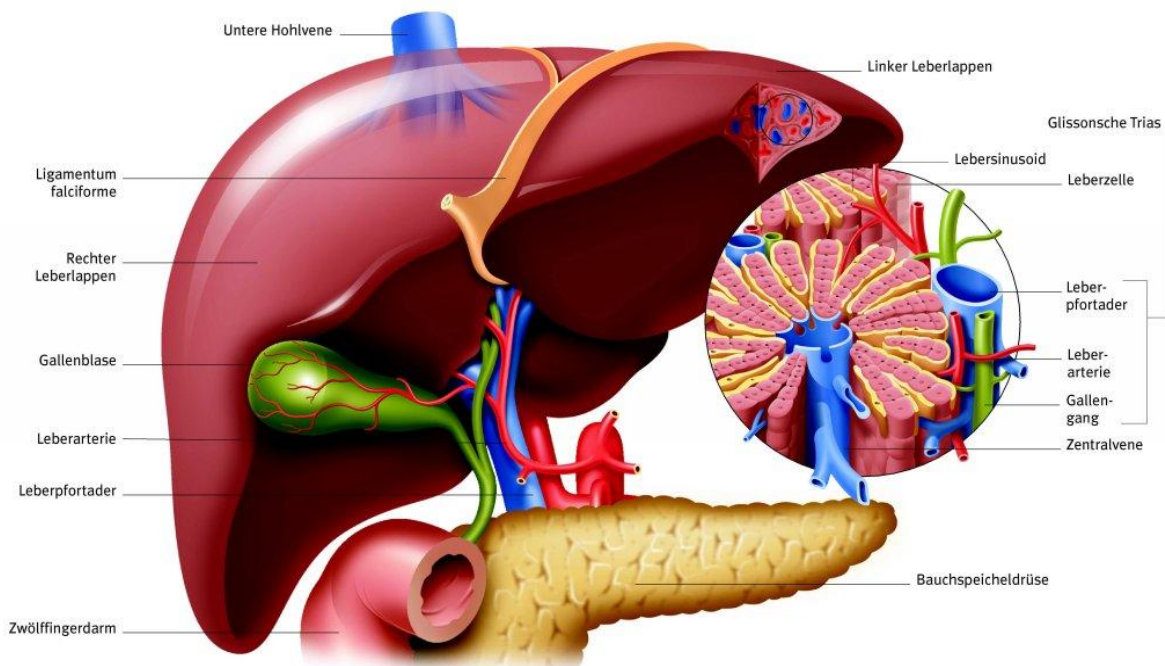
Tabelle 1:	Verteilung des Patientenkollektivs nach Ätiologien für die Präparation primärer humaner HSC	40
Tabelle 2:	Zelldichte bei RNA- und Protein-Experimenten	48
Tabelle 3:	Reaktionsansätze für QRT-PCR	53
Tabelle 4:	Cyclerprogramme	53
Tabelle 5:	Primärantikörper und ihre Anwendung	58
Tabelle 6:	Sekundärantikörper und ihre Verwendung	58
Tabelle 7:	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz	62
Tabelle 8:	SNP, Lokalisation, Primersequenz und PCR-Produktgröße	64
Tabelle 9:	Mastermix	64
Tabelle 10:	SNP und Annealingtemperatur	65
Tabelle 11:	SNP und Restriktionsenzyme	66
Tabelle 12:	SNP und Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau	67
Tabelle 13:	allgemeine Charakteristika der Kohorten	69

# 1 Einführung

## 1.1 Leber

Die größtenteils intraperitoneal im Oberbauch befindliche Leber (Gesamtgewicht ca. 1,5 kg) ist sowohl das zentrale Stoffwechselorgan als auch die größte Drüse des menschlichen Körpers. Durch die in Hepatozyten stattfindende Glykogensynthese und -speicherung sowie die Glukoneogenese hat die Leber eine wichtige Funktion in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels. Zudem nimmt sie eine zentrale Rolle im Lipid-, Lipoprotein- und Proteinstoffwechsel sowie in der Aufrechterhaltung des Säure/Basen-Haushaltes ein. Neben der Bildung nichtessentieller Aminosäuren, von Komponenten der unspezifischen Abwehr und von Proteinen der Blutgerinnung speichert das Organ unter anderen Vitamine, Metalle und Triglyzeride. Aufgrund ihrer Vielzahl an Enzymen ist die Leber ein wichtiges Entgiftungs- und Exkretionsorgan des menschlichen Körpers: Körpereigene und -fremde Stoffe werden verstoffwechselt und anschließend über den Harn und/oder die Galle ausgeschieden. Als exokrine Drüse produziert die Leber die Gallenflüssigkeit, welche im Wesentlichen Wasser, Gallensäuren, Bilirubin, Cholesterin und Lecithin enthält und – in den Darm abgegeben – der Emulgierung der Nahrungsfette dient. Über den enterohepatischen Kreislauf gelangt sie größtenteils zur Leber zurück.

Die Form der Leber wird einerseits durch eine straffe bindegewebige Kapsel (*Capsula fibrosa*) und andererseits durch den Gefäßtonus stabilisiert. Ihre Blutversorgung erfolgt über die *Venae portae* und die zwei Äste der *Arteria hepatica propria*, die über die *Porta hepatis* in die Leber gelangen (siehe Abbildung 1). Während über die *Vv. portae* nährstoffreiches, venöses Blut aus ungepaarten Bauchorganen zur weiteren Verarbeitung an die Leberläppchen herangeführt wird, dient die Zufuhr von sauerstoffreichem Blut über die *A. hepatica propria* der Ernährung. Zusätzlich zu den Blut führenden Gefäßen ist die *Porta hepatis* Eintrittspforte für Nervenfasern und Lymphgefäße und Austrittspforte des *Ductus hepaticus*, über den die Galle in den Darm gelangt. Anhand der Verzweigungen der *Vv. portae* und *Aa. hepaticae* sowie des *Ductus hepaticus* kann die Leber in den linken Leberlappen mit den Segmenten I-IV und in den rechten Leberlappen mit den Segmenten V-VIII unterteilt werden (Drenckhahn *et al.*, 1994).



**Abbildung 1: Die Leber mit ihrer funktionellen Einheit.**

Schematische Darstellung modifiziert nach wissenmedia GmbH Gütersloh.  
([www.hepatitis-bw.de](http://www.hepatitis-bw.de)).

Funktionell besteht die Leber aus 1–1,5 Mio. Leberläppchen (*Lobuli hepatici*), welche mit ihrer polygonalen Oberfläche an mehreren Portalfeldern mit ihren Glisson'schen Trias' (bestehend aus *A. interlobularis*, *V. interlobularis* und *Ductus bilifer interlobularis*) grenzen und somit von mehreren Ästen der *V. portae* und *A. hepatica* versorgt werden (Drenckhahn *et al.*, 1994). Ein Leberläppchen besteht aus Hepatozyten und den Endstrecken der Blutgefäße, den sogenannten Lebersinusoiden. Zwischen letzteren befinden sich Hepatozyten, die mit ihren spezialisierten apikalen Wänden aneinander stoßen und interzelluläre Gallenkanälchen (*Canaliculi bilialis*) bilden. Durch das fenestrierte Endothel der Lebersinusoiden – gebildet von Sinusoidalen Endothelzellen der Leber – findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Leber statt (Drenckhahn *et al.*, 1994). Zur Aufgabe der Hepatozyten zählen die Aufnahme und Verstoffwechselung zugeführter Fette, Proteine und Kohlenhydrate sowie die Produktion der Galle.

Lebersinusoiden und Hepatozyten sind durch den flüssigkeitsgefüllten sog. Disse'schen Raum voneinander getrennt. Obwohl in diesem Raum keine Basallamina vorhanden ist, können in ihm Basalmembranproteine wie Laminin, Fibronectin (FN), verschiedene Proteoglykane und Kollagenfibrillen nachgewiesen werden. Am und im Sinusendothel finden sich Kupffer-Zellen (KC) – die spezialisierte Makrophagenpopulation der Leber –, welche über ihre Protrusionen mit Hepatozyten und dem Disse'schen Raum verbunden sind. Diese immunologisch dem Mononukleären

Phagozytensystem (MPS) bzw. histologisch dem Retikuloendothelialen System (RES) zugeordneten Zellen phagozytieren und eliminieren Krankheitserreger und Fremdstoffe und sind in der Lage, partikuläre Bestandteile des Blutes zu phagozytieren (Junqueira *et al.*, 1996).

Eine weitere Zellpopulation im Disse'schen Raum sind die hepatischen Sternzellen (HSCs). Bei ihnen handelt es sich um eine quantitativ relativ kleine Population, die sich sowohl in einem ruhenden als auch einem aktivierten Zustand befinden kann (Friedman *et al.*, 2008a). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf diskrete Funktionen dieser Zellen.

## 1.2 Hepatische Sternzellen

Die zu den nicht-parenchymatischen Zellen gehörenden HSC – auch Ito-Zellen genannt – befinden sich im perisinusoidalen Disse'schen Raum. Erstmals wurden sie von Kupffer im Jahre 1876 als „Lebersternzellen“ beschrieben (Henderson *et al.*, 2007). Obwohl sie nur 15% des Anteils in einer normalen Leber ausmachen, speichern sie im Ruhezustand ca. 80-90% des Vitamins A des menschlichen Organismus' in Form von Retinylester (Boyer *et al.*, 2012; Friedman *et al.*, 2008b). Des Weiteren können auch signifikante Mengen an Phospholipiden, Triazylglyzeriden, Cholesterin und freien Fettsäuren (FFA = *free fatty acids*) in HSCs nachgewiesen werden (Friedman *et al.*, 2008b).

Unter physiologischen Konditionen dienen ruhende HSCs der Retinoid-Homöostase und dem *remodeling* der extrazellulären Matrix (ECM) durch die Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten wie etwa den Matrix-Metalloproteasen (MMP) und der *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) (Das *et al.*, 2008). Als Hauptquelle der ECM-Produktion spielen aktivierte HSCs eine entscheidende Rolle in der Genese der Leberfibrose (Boyer *et al.*, 2012; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2008a). Dabei findet ein Transit von Vitamin A-speichernden, ruhenden HSCs zu proliferativen, fibrogenen und kontraktile, aktivierten HSCs statt. Dieser Transit vollzieht sich in einem zweiphasigen Prozess (Initiation und Perpetuation) (siehe Abbildung 2).

In der auch als prä-inflammatorische Phase bezeichneten Initiationsphase erfolgen Veränderungen der Genexpression und des Phänotyps mittels parakriner Stimulation durch benachbarte Zellen wie Hepatozyten, KC, *liver sinusoidal endothelial cells* (LSEC) und Thrombozyten (Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008). Nach Einwanderung in den Disse'schen Raum und dortige Aktivierung stimulieren KC durch Zytokin-Ausschüttung und reaktiven Sauerstoff die Matrixsynthese, Vitamin A-Abgabe und

Zellproliferation der HSCs (Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008). Während Thrombozyten durch parakrine Signalstoffe wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor-β* (TGF-β) und *epidermal growth factor* (EGF) die HSCs aktivieren, aktivieren Hepatozyten die HSCs durch reaktiven Sauerstoff, Lipidperoxid-Bildung und ihre eigene Apoptose (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2012). LSECs nehmen durch die Umwandlung der latenten zur aktiven Form des TGF-β (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008) und durch die Produktion einer Splicing-variante des zellulären FNs an der HSC-Aktivierung teil (Boyer *et al.*, 2012). Durch unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl eine parakrine HSC-Aktivierung durch direkte Aufnahme apoptotischer Hepatozytenfragmente als auch eine indirekte HSC-Aktivierung durch KC nach deren Phagozytose der apoptotischen Hepatozytenfragmente nachgewiesen werden (Canbay *et al.*, 2003a; Canbay *et al.*, 2003b).

Parakrine und autokrine Rückkopplungsmechanismen arretieren den aktivierten HSC-Phänotyp in der Perpetuationsphase, wodurch die Ausbildung der Fibrose aufrechterhalten wird. In dieser Phase werden die HSCs zur Matrixdegradation, Proliferation, Fibrogenese, Chemotaxis, Kontraktilität und Zytokin-Ausschüttung angeregt und erleiden einen Retinoidverlust (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008; Dechêne *et al.*, 2010).

Die Matrixdegradation ist ein Schlüsselereignis der hepatischen Fibrogenese. Dabei erfolgen eine frühe Zerstörung der normalen hepatischen Matrix durch MMPs und ihr beschleunigter Ersatz durch Narbengewebe (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a). Die MMP-bedingte Inhibition der Matrixdegradation kann aus einer Inaktivierung resultieren, die durch die Bindung von TIMPs an MMPs hervorgerufen wird. Zusätzlich erfolgt mittels TGF-β-Stimulation eine Verschiebung des Expressionsgleichgewichtes von MMPs und TIMPs zu Gunsten der TIMPs (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a).

Als weiteres Zeichen der Perpetuation ist die Fibrogenese der HSCs durch den Anstieg der HSC-Anzahl und eine gesteigerte ECM-Produktion gekennzeichnet. Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix – Kollagen Typ I (Col1α) – steigert ihre eigene Produktion durch transkriptionale und posttranskriptionale Modifikationen. Allerdings gilt TGF-β als potentester Stimulus der Kollagen-Synthese, welches sowohl parakrin als auch autokrin die Signalwege des *homolog of mothers against decapentaplegic drosophila* (Smad) und den Signalweg der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) aktiviert (Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008). Zusätzlich steigert TGF-β über die Aktivierung der MAPK p38 die Halbwertszeit der

Kollagen Typ I-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) um das bis zu 20-fache (Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008). Zudem stimuliert TGF- $\beta$  die Produktion anderer Matrixkomponenten wie etwa des zellulären FN und von Proteoglykanen (Friedman *et al.*, 2008). Weitere fibrogene Signale wie der *connective tissue growth factor* (CTGF – dessen Expression durch eine Hyperglykämie und eine Hyperinsulinämie heraufreguliert wird), sowie Leptin und Lipidperoxidationsprodukte bewirken einen Anstieg der ECM-Produktion (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2006). Somit verschiebt sich das physiologische Gleichgewicht zwischen ECM-Synthese und -Abbau kontinuierlich zu Gunsten einer zunehmenden Synthese.

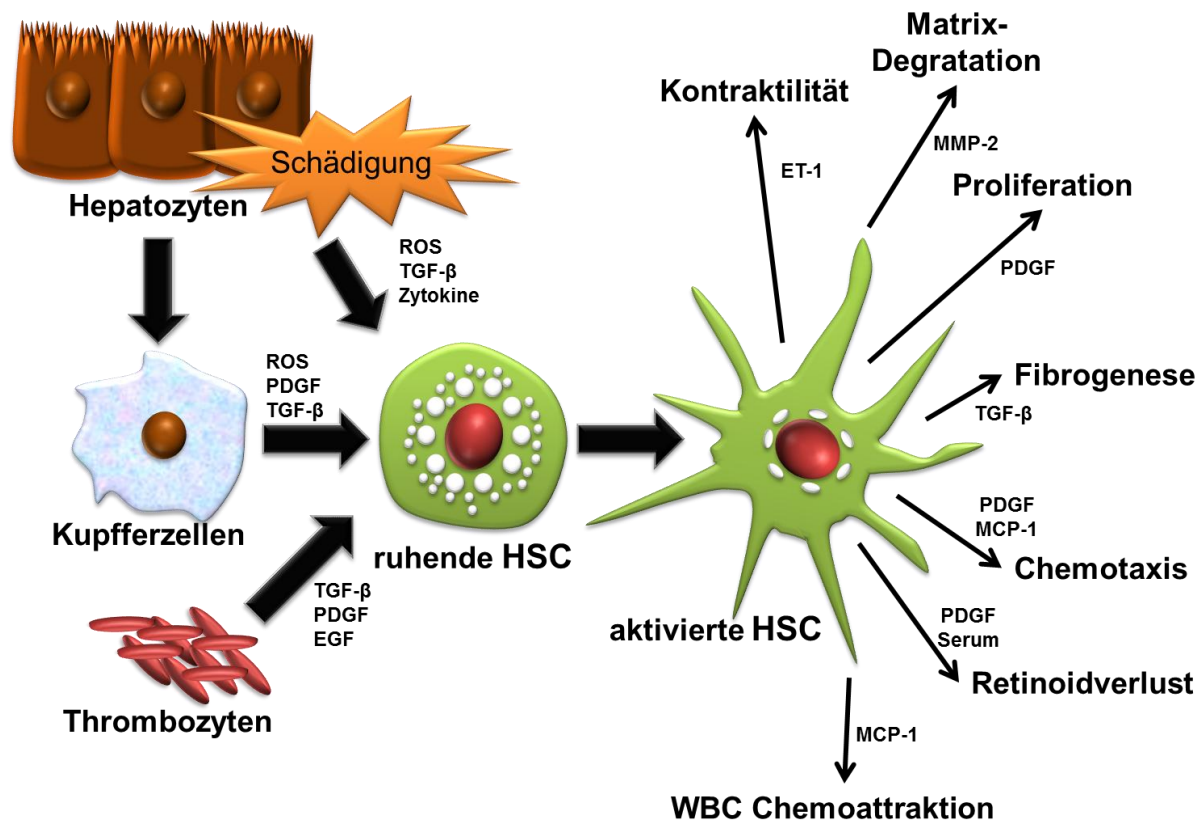
Der Transit ruhender zu aktivierten HSCs verändert das Proliferationsverhalten dieser Zellen durch verschiedene mitogene Faktoren: Über die Induktion des PDGF-Rezeptors während der frühen HSC-Aktivierung kann mit PDGF das potenteste Mitogen die HSC-Proliferation durch Aktivierung des MAPK-Signalweges und des Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase-Signalweges stimulieren. Als weitere mitogene Faktoren wirken der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Thrombin, EGF, Endothelin-1 und der *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a).

Die Chemotaxis der HSCs wird durch dieselben Zytokine und Chemokine stimuliert, welche die hepatische Inflammation auslösen. Hierzu zählen Interleukin 6 (IL-6), PDGF, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und *CXC-motive chemokine receptor 3* (CXCR3) (Winau *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a; Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008).

Zudem erhalten jene HSCs, die in den Kollagenbändern lokalisiert sind, infolge ihrer gesteigerten Expression des Zytoskelettproteins  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) die Fähigkeit zur Kontraktilität. Diese ist ein wichtiger Faktor für den frühen und späten Anstieg des portalen Widerstandes während der Leberfibrose (Friedman *et al.*, 2008a; Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008). Neben Endothelin-1 regulieren auch Eicosanoide, Vasopressin, Adrenomedullin und Arginin die Kontraktilität der HSCs (Boyer *et al.*, 2012). Einige Untersuchungen hinsichtlich der Regulation der Kontraktilität lassen vermuten, dass der portale Hypertonus durch den Abfall von Stickstoffmonoxid und den Anstieg von Endothelin-1 hervorgerufen wird (Boyer *et al.*, 2012; Tsukada *et al.*, 2006).

Eine HSC-Aktivierung wird vom Verlust des perinukleären Retinoids begleitet (Boyer *et al.*, 2012; Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008), wobei bis heute nicht erklärt werden konnte,

ob und wie der Retinoidverlust ggf. zur Aktivierung der HSCs beiträgt (Tsukasa *et al.*, 2006).



**Abbildung 2: Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen.**

Schematische Darstellung der Initiation und Perpetuation von HSCs. Die Aktivierung ruhender HSCs wird durch Kupfer-Zellen, Thrombozyten und geschädigte Hepatozyten stimuliert. Aktivierte HSCs bewirken durch die Ausschüttung spezieller Mediatoren die gezeigten Veränderungen. (in Anlehnung an Boyer *et al.*, 2012 und Mormone *et al.*, 2011)

### 1.3 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Unter den Hepatopathien stellt die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung [NAFLE; Englisch: *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)] mit steigender Prävalenz (20–30% bei Erwachsenen / ca. 8% bei Kindern) die Hauptform dar (Barchetta *et al.*, 2011; Bian *et al.*, 2012; Fuji *et al.*, 2012; Roth *et al.*, 2011). Die in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals erkannte NAFLD konnte 20 Jahre später klinisch bestätigt und erst weitere 30 Jahre später histopathologisch charakterisiert werden (Hafeez *et al.*, 2013). Die *International Diabetes Federation* (IDF) klassifiziert eine NAFLD als metabolisches Syndromstadium, wenn mindestens drei der fünf Parameter „viszerale Adipositas“, „hohe Serumglukose“, „hohe Triglyzeridkonzentration“, „erhöhter Blutdruck“ und/oder „verminderte *high density lipoprotein* (HDL)- und Cholesterinspiegel“ vorliegen (Anty *et al.*, 2011; Vanni *et al.*, 2010). Charakteristisches Kennzeichen der

NAFLD, welche auf einer Störung des hepatozytären Fett- und Triglyzeridmetabolismus' beruht, ist die exzessive Einlagerung von Fetten – hauptsächlich in Form von Triglyzeriden – in Hepatozyten (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005). Diese Akkumulation wird vor allem durch Insulin, aber auch durch lokale Faktoren, welche in den verschiedenen Leberzelltypen produziert werden, bewirkt (Rombouts *et al.*, 2010). Die Pathogenese der NAFLD wird sowohl durch eine kalorienreiche Ernährung mit verminderter körperlicher Aktivität, als auch durch hormonelle Störungen bzw. Veränderungen wie beim Diabetes mellitus Typ 2 und bei einer Schwangerschaft, oder durch manche Medikamente (z.B. Tamoxifen, Glukokortikoide oder Diltiazem) ausgelöst bzw. begünstigt (Farrell *et al.*, 2008; Kopec *et al.*, 2011).

Die NAFLD umfasst ein weites Spektrum an Lebererkrankungen. Innerhalb dessen kann eine einfache Steatose über eine Steatohepatitis [*non-alcoholic steatohepatitis* (NASH)] letztendlich in eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) einmünden (Anty *et al.*, 2011; Hafeez *et al.*, 2013; Ertle *et al.*, 2011). Die korrekte molekulare Pathogenese der NAFLD ist unklar. Im Jahre 1988 wurde von Day und James die *two-hit*-Hypothese aufgestellt (Anty *et al.*, 2011; Rombouts *et al.*, 2010; Fuji *et al.*, 2012). Mit dem Endresultat einer hepatischen Steatose, ist der erste Schritt (bzw. „*hit*“) stark mit einer Insulinresistenz verbunden. Durch anormalen Anstieg des FFA-Influx' in die Leber und erhöhte hepatozelluläre Lipogenese erfolgt eine übermäßige Akkumulation von Fett in Hepatozyten (Rombouts *et al.*, 2010; Tsukada *et al.*, 2006; Vanni *et al.*, 2010). Morphologisch kann die hepatische Steatose in zwei Formen unterschieden werden. Neben der makrovesikulären Steatose (große Lipidtröpfchen in Hepatozyten) als prädominierender Form in der NAFLD gibt es auch eine mikrovesikuläre Steatose sowie mikro/makrovesikuläre Mischformen (Farrell *et al.*, 2008). Die Entwicklung der Steatose zur Steatohepatitis, die durch verschiedene Mechanismen reguliert wird, stellt den zweiten Schritt (bzw. „*hit*“) dar. Ein progressionsfördernder Faktor ist die angestiegene Produktion von reaktivem Sauerstoff, der durch vermehrte mitochondriale und peroxisomale  $\beta$ -Oxidation in Hepatozyten gebildet wird (Vanni *et al.*, 2010). Weitere Faktoren für die Progression sind oxidativer Stress mit seiner hemmenden Wirkung auf die Hepatozyten-Replikation, Lipotoxizität, mitochondriale Dysfunktion, hepatische Steatose, exzessives Absterben von Hepatozyten und Inflammation (Vanni *et al.*, 2010; Rombouts *et al.*, 2010; Fuji *et al.*, 2012). Histologisch ist die NASH von der einfachen Steatose unterscheidbar. Bei letzterer findet man ein Auftreiben (engl.: *ballooning*) der Hepatozyten, lobuläre Inflammation, Fibrose und hepatozelluläre



Schädigungen (Farrell *et al.*, 2008; Rombouts *et al.*, 2010). Über 20% der Patienten mit NASH entwickeln im Laufe der Zeit eine Leberzirrhose und Leberversagen, wobei sich die Zirrhose in 5–8% der Fälle innerhalb von 5 Jahren entwickelt (Bian *et al.*, 2012; Barchetta *et al.*, 2011).

Die Zwei-Schritt-Hypothese wurde kürzlich durch die multiparallele Hit-Hypothese von Tilg und Moschen ins Wanken gebracht. Demnach sollen Insulinresistenz und zelluläre Dysfunktion konstant vorhanden sein (Anty *et al.*, 2011). Nach der multiparallelen Hypothese wird die Inflammation als Konsequenz vieler paralleler Hits – hervorgehend aus dem viszeralen Fettgewebe und/oder dem Darm – verstanden. Nach dieser Hypothese stellen enterale bakterielle Nebenprodukte, Zytokine, Adipokine, endoplasmatischer Retikulum-Stress und das angeborene Immunsystem Schlüsselfaktoren der Pathogenese der NASH dar (Fuji *et al.*, 2012). Des Weiteren verschlechtern zytotoxische Produkte der Lipidperoxidation die Hepatozytenfunktion; die zur hepatozytären Apoptose führen kann (Fuji *et al.*, 2012; Alkhouri *et al.*, 2011).

#### **1.4 NAFLD, Fibrose und HSC-Aktivierung**

Als Lebermanifestation des metabolischen Syndroms hat die NAFLD Einfluss auf die Fibrose. Neben dem schon erwähnten Einfluss von Insulin auf die Fettakkumulation in Hepatozyten kann das Syndrom ruhende HSCs im Disse'schen Raum aktivieren und die CTGF-Produktion stimulieren (Anty *et al.*, 2011). CTGF ist in die HSC-Aktivierung und ECM-Produktion involviert (Rombouts *et al.*, 2010). Im Tiermodell wurde in adipösen Ratten durch eine *high-fat diet* eine Insulinresistenz und ein Anstieg des TGF- $\beta$  (Hauptstimulus der HSC-Aktivierung) nachgewiesen induziert (Fuji *et al.*, 2012). *In vitro* wurden HSCs in ihrer Proliferation und Akkumulation von Kollagen Typ I durch *insulin growth factor* (IGF) aktiviert (Anty *et al.*, 2011; Rombouts *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008). Indirekte oder direkte Mechanismen, wie FFA-Influx, Lipidperoxidation, endoplasmatischer Retikulum-Stress und oxidativer Stress, sind mit der bei der NAFLD vorliegenden Insulinresistenz assoziiert und können zur Apoptose der Hepatozyten führen (Hafeez *et al.*, 2013). Apoptotische Hepatozytenfragmente können von HSCs phagozytiert werden, wodurch diese aktiviert werden (Canbay *et al.*, 2003b). Adipokine, wie Leptin, Adiponektin und Resistin, spielen in der Pathogenese der NAFLD eine wichtige Rolle. Die während der NAFLD verzeichnete Dysbalance zwischen Leptin und Adiponektin zu Gunsten des Leptins bewirkt HSC-Aktivierung, Stimulation der Kollagen-Synthese (Li *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2007) und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie *tumor necrosis factor- $\alpha$*

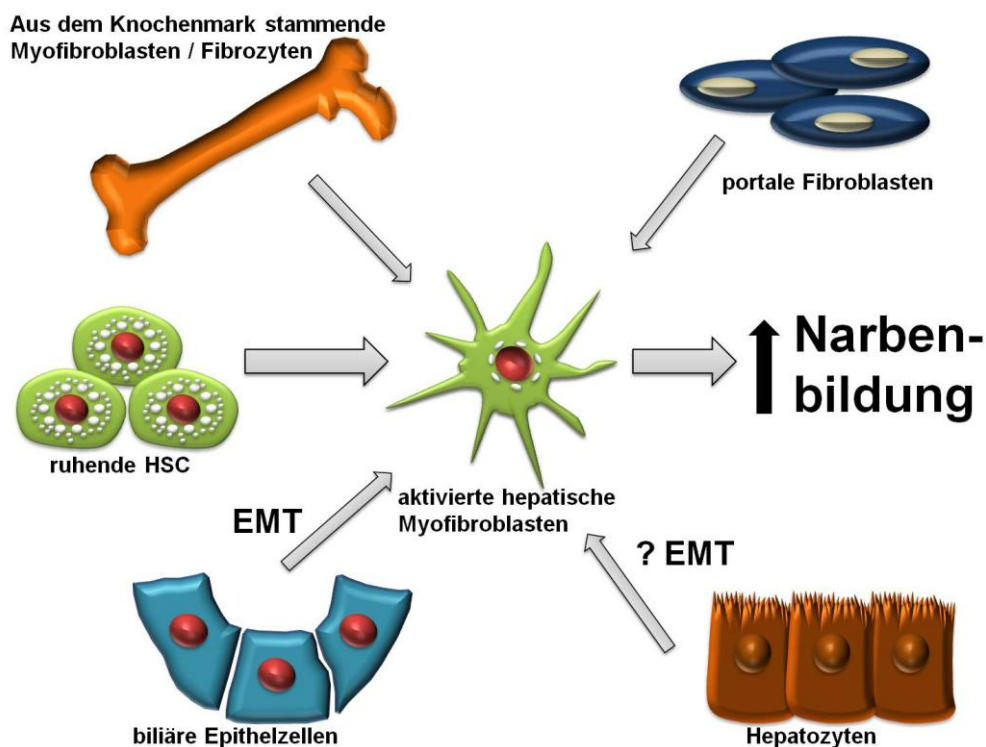
(TNF $\alpha$ ), IL-6 und IL-12 (Fuji *et al.*, 2012). Des Weiteren bewirkt Leptin, durch die Dysbalance zwischen TIMP 1 und MMP 1 zu Gunsten von TIMP 1, eine Hemmung der ECM-Degradation (Anty *et al.*, 2011; Fuji *et al.*, 2012). Die in der NAFLD nachgewiesene erhöhte Serumkonzentration von Resistin steigert den Serumspiegel der Blutglukose, der Triglyzeride und des Cholesterols, welche als Mediatoren der Lipotoxizität wirken (Fuji *et al.*, 2012; Alkhouri *et al.*, 2011).

## **1.5 Hepatische Fibrose**

Die hepatische Fibrose ist eine Variante der reversiblen Wundheilungsantwort auf sowohl eine akute als auch eine chronische Leberentzündung unterschiedlicher Ätiologien (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Boyer *et al.*, 2012). Während bei einem akuten bzw. selbstlimitierenden Insult eine transiente Änderung mit anschließender Wiederherstellung der normalen Leberarchitektur erfolgt, führt eine chronische Verletzung – durch Inflammation und persistierende ECM-Akkumulation – zur progressiven Substitution des Leberparenchyms durch Narbengewebe (Hernandez-Gea *et al.*, 2011). Neben der Ätiologie hängt der als dynamischer Prozess bezeichnete hepatische Fibroseprogress von weiteren Faktoren, wie der Region der Verletzung, der Quelle der involvierten fibrotischen Zellen und Art des dominanten fibrogenen Mechanismus' ab (Hernandez-Gea *et al.*, 2011). Im speziellen Fall der NAFLD handelt es sich um eine perisinusoidale oder perizelluläre Fibrose (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Farrell *et al.*, 2008). Neben der NAFLD zählen in Industrieländern zu den Hauptursachen der Leberfibrose chronische virale Entzündungen und Alkoholabusus (Bataller *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2006; Tsukada *et al.*, 2006).

Definitionsgemäß stellt die hepatische Fibrose eine Leberzellschädigung dar, welche mit Entzündungen und ständigem Gewebeumbau einhergeht (Bataller *et al.*, 2005). Neben der unzureichenden Leberregeneration werden Änderungen der Leberarchitektur, der extrazellulären Matrix-Homöostase, des Zellphänotyps und des Zytokinemilieus beobachtet (Wells *et al.*, 2006). Die hepatische Fibrose beeinflusst nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der ECM (Hernandez-Gea *et al.*, 2011). Dabei wird das in der normalen Leber straff organisierte molekulare Netzwerk (membranartige Basismatrix) im Disse'schen Raum, der die funktionelle und strukturelle Integrität des Leberparenchyms sichert, durch den interstitiellen Matrixtyp mit fibrillärem Kollagen ersetzt (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Boyer *et al.*, 2012). Während des Progresses steigt die Gesamtmasse an Kollagen (Typ I und III) und anderer ECM-Proteine, wie Proteoglykane, Hyaluronsäure, Fibronektin, Laminin und

Elastin, um das Drei- bis Fünffache. Die exzessive ECM-Einlagerung wird durch eine gesteigerte Synthese mit simultan stattfindender Suppression der Matrixdegradation erzielt an (Tsukada *et al.*, 2006 ; Boyer *et al.*, 2012; Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Mormone *et al.*, 2011). Als zelluläre Quelle der ECM-Produktion in der Leber werden heute verschiedene Zellpopulationen begriffen, die zu Myofibroblasten mit kontraktile und fibrogenen Eigenschaften differenzieren können (Wells *et al.*, 2006). Dabei werden neben den im Disse'schen Raum ansässigen HSCs - Hauptproduzenten - als weitere Quellen der ECM-Produktion portale Fibroblasten, Knochenmark-abgeleitete Zellen und der sog. *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) unterliegende, biliäre Epithelzellen gezählt (siehe Abbildung 3) (Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Tsukada *et al.*, 2006, Iwaisako *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008).



**Abbildung 3: Potentielle Quellen hepatischer Myofibroblasten.**

Schematische Darstellung modifiziert nach Henderson *et al.*, 2007.  
(EMT = *epithelial-mesenchymal transition*)

Die als reversibel geltende Fibrose kann in ihrer Progression in das irreversible zirrhotische Krankheitsbild übergehen. Kennzeichen einer Zirrhose sind Zerstörungen der lobulären und vaskulären Architektur, Knotenbildung im regenerativen Parenchym, venöse Verstopfungen und Bildung vaskularisierender fibrotischer Septen (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Boyer *et al.*, 2012; Mormone *et al.*, 2011;

Tsukada *et al.*, 2006). Die hieraus resultierende hepatozelluläre Dysfunktion und der Anstieg des intrahepatischen vaskulären Widerstandes führt zur hepatischen Insuffizienz und portalen Hypertension (Bataller *et al.*, 2005; Mormone *et al.*, 2011).

## **1.6 Therapie der NAFLD und der resultierenden Fibrose**

Bei der NAFLD handelt es sich um keine isolierte Lebererkrankung, sondern eher um die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms. Zusammen mit dem meist asymptomatischen Verlauf, der Abwesenheit spezifischer klinischer Symptome und den laborchemischen Parametern ergeben sich Probleme in der Behandlung der NAFLD (Kopec *et al.*, 2011; Hafeez *et al.*, 2013). Aufgrund der starken Assoziation zwischen NAFLD und dem metabolischen Syndrom zielen aktuelle Therapieansätze auf die Behandlung der Adipositas und die Verbesserung der metabolischen Störungen (Hafeez *et al.*, 2013). Bei den meisten Patienten werden Adipositas und Insulinresistenz gleichzeitig beobachtet (Fickert *et al.*, 2010). Derzeitig sind keine Medikamente zur Behandlung der NAFLD zugelassen (Hafeez *et al.*, 2013). Daher findet die Behandlung der Adipositas hauptsächlich durch Veränderungen im Lebensstil, wie vermehrte körperliche Aktivität und kalorienärmere Ernährung, statt (Kopec *et al.*, 2011; Fickert *et al.*, 2010; Tsukada *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2012). Zur Verbesserung der Insulinresistenz eingesetzte Insulinsensitizer (z.B. Metformin) sollen neben einer Gewichtsreduktion die Inflammation und Lipogenese hemmen und die FFA-Oxidation verbessern (Kopec *et al.*, 2011; Hafeez *et al.*, 2013). Weitere medikamentöse Interventionen – z.B. mit Orlistat (einem gastrointestinalen und pankreatischen Lipaseinhibitor), Angiotensin-Rezeptorantagonisten und TNF- $\alpha$ -Antagonisten – lassen aufgrund kleinerer Studien einen Nutzen vermuten, der aber in Studien an größeren Kollektiven verifiziert werden muss (Kopec *et al.*, 2011; Fickert *et al.*, 2010). Die bariatrische Chirurgie zielt primär auf die Reduktion der Adipositas ab. Zusätzlich wird neben der Gewichtsreduktion offenbar eine Normalisierung der Insulinresistenz sowie eine Verminderung der Dyslipidämie und Inflammation erzielt (Hafeez *et al.*, 2013). Jedoch sind weitere Studien erforderlich, um die bariatrische Chirurgie eindeutig als Option in der Behandlung der NAFLD zu verifizieren (Kopec *et al.*, 2011; Fickert *et al.*, 2010; Hafeez *et al.*, 2013).

Die Behandlung der Fibrose als Charakteristikum der NASH ist bis heute problematisch: Neben dem Fehlen eines spezifischen antifibrotischen Wirkstoffs stellen die multifaktoriellen und komplexen Fibrosemechanismen, die tlw. zwischen Tiermodell und Humanstudien divergierenden Daten und fehlende Langzeitversuche ein

Problem in der Therapie und Erforschung neuer Therapieansätze dar (Boyer *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008). Derzeitige Therapien zielen daher auf die Beseitigung der Ursache sowie die Behandlung der Symptome und der Begleiterscheinungen der hepatischen Fibrose ab (Gines *et al.*, 2012). Neben Studien mit Antioxidantien sowie mit anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Agenzien fokussieren die meisten Untersuchungen derzeit auf die Regression der Fibrose. Dies soll durch die Entfernung der Myofibroblasten, durch Reduktion der Aktivierung, Steigerung der Apoptose oder der Seneszenz sowie der Matrix-Remodellierung, bewirkt werden (Boyer *et al.*, 2012; Tsukada *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Hierbei stehen HSCs im Zentrum. Zu den neuen potentiellen antifibrogenen Agenzien im Menschen sollen in naher Zukunft Anti-TGF- $\beta$ - und Anti-PDGF-Antikörper, Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) sowie Antagonisten des *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) zählen (Boyer *et al.*, 2012). Zudem könnten synthetische Duplex-*small interfering* RNA (siRNA)-Therapien durch ihre hohe Gensequenz-Spezifität und ihre Passage in sinusoidale Endothel-Lücken der fibrotischen Leber ggf. ideale Kandidaten zur Therapie der Leberfibrose darstellen (Mormone *et al.*, 2011). Als effektivste Methode zur Behandlung einer fortgeschrittenen Fibrose und Zirrhose gilt allerdings bis heute die Lebertransplantation (Tsukada *et al.*, 2006).

## 1.7 NAFLD und Vitamin D

Patienten mit NAFLD weisen meistens einen erhöhten *body mass index* (BMI) auf, der für die Limitation der Vitamin D (VD)-Bioverfügbarkeit aufgrund seiner Einlagerung im Fettgewebe verantwortlich sein könnte (Barchetta *et al.*, 2011; Rhee *et al.*, 2013). Verschiedene Studien konnten eine inverse Korrelation zwischen NAFLD und VD aufzeigen, aber auch eine negative Korrelation zwischen VD und der Alanin-Aminotransferase-(ALT) Serumkonzentration (Katz *et al.*, 2010; Geier *et al.*, 2011; Barchetta *et al.*, 2011).

Wu *et al.* (2011) konnten eine Beteiligung des VD-Mangels an dem Anstieg des oxidativen Stresses und der Inflammation nachweisen. Der VD-Serumspiegel ist mit dem histologischen Schweregrad der hepatischen Steatose, der Nekro-Inflammation und der Fibrose assoziiert (Geier *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2011; Kitson *et al.*, 2012). Literaturdaten lassen zusätzlich vermuten, dass eine geringe VD-Serumkonzentration an der Entwicklung der Insulinresistenz, des Hypertonus' und des metabolischen Syndroms beteiligt ist (Katz *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2011). Des Weiteren prädisponiert ein niedriger VD-Serumspiegel die intrahepatische Lipidakkumulation,

die für die Pathogenese der NAFLD essentiell ist (Barchetta *et al.*, 2011). Durch VD-Supplementation konnte eine FFA-induzierte Insulinresistenz im peripheren Gewebe und in Hepatozyten vermindert werden (Barchetta *et al.*, 2011).

Das von Adipozyten produzierte Peptidhormon Resistin spielt eine wichtige Rolle in der Insulinresistenz und Inflammation. Bei NAFLD-Patienten ist seine Serumkonzentration erhöht und korreliert mit dem histologischen Grad der Erkrankung (Fuji *et al.*, 2011; Kwok *et al.*, 2013). Interessanterweise bewirkt ein VD-Mangel einen Anstieg der Resistin-Konzentration (Roth *et al.*, 2011).

In einer NASH-Studie in einem Rattenmodell konnten Nakano *et al.* (2011) die Progression der NAFLD durch eine Phototherapie positiv beeinflussen: Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden eine Verbesserung der Insulinresistenz, der hepatischen Steatose und der Leberhistologie (hinsichtlich Hepatozyten-Apoptose, Inflammation und Fibrose) erzielt. Zusätzlich wurde die Expression von TGF- $\beta$  und  $\alpha$ -SMA vermindert und gleichzeitig die Expression des antifibrogenen Adiponektins gesteigert.

Supplementation mit VD supprimiert die HSC-Proliferation sowie die Expression von TIMP und Kollagen Typ I *in vitro* (Kitson *et al.*, 2012). *In vivo* an Tiermodellen verhinderte eine VD-Applikation sowohl die Expression von  $\alpha$ -SMA und Kollagen Typ I als auch die durch Thioacetamin induzierte Zirrhose (Kitson *et al.*, 2011).

Da in der vorliegenden Arbeit ein umfassendes Panel an Effekten des VD und seiner Metaboliten untersucht wurde, wird die Biologie der Calciferole im Folgenden noch detaillierter dargestellt.

## 1.8 Vitamin D

VD bzw. Calciferole generell sind eine Gruppe fettlöslicher, photosensibler Steranderivate. Das pflanzliche Ergocalciferol (VD<sub>2</sub>) und das tierische Cholecalciferol (VD<sub>3</sub>), welche aus den jeweiligen Provitaminen Ergosterol bzw. 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) entstehen, sind die wichtigsten Calciferole. VD<sub>2</sub> und VD<sub>3</sub> unterscheiden sich in ihren Seitenketten, wobei VD<sub>2</sub> eine Methylgruppe am 24-C-Atom und eine Doppelbindung zwischen den C22- und C23-Atom aufweist (Bikle *et al.*, 2010). Dadurch zeigen sie Differenzen in der Bindung an Trägerproteine im Plasma und in ihrem Metabolismus (Bikle *et al.*, 2010). Aufgrund der im Organismus stattfindenden Eigensynthese, der endokrinen Kontrolle der VD-Synthese und der rezeptorvermittelten Effekte werden die biologisch aktiven VD-Formen im eigentlichen Sinne nicht als „Vitamine“, sondern als Hormone angesehen.

Der tägliche VD-Bedarf des menschlichen Körpers wird zu >90% durch die epidermale und dermale Phototransformation von VD<sub>3</sub> gedeckt. Nur ein geringer VD-Teil wird durch die Nahrung aufgenommen, da nur wenige Nahrungsmittel nennenswerte VD-Mengen aufweisen (Holick *et al.*, 2004). Heutzutage leiden weltweit Millionen Menschen unter einem VD-Mangel (Geier *et al.*, 2011).

Die Synthese des Hauptanteils an im Blut zirkulierenden synthetisierten biologisch aktiven VD<sub>3</sub> unterliegt drei Aktivierungsprozessen. Dem gegenüber unterliegt das mit der Nahrung aufgenommen VD nur zwei Aktivierungen.

Der initiale Schritt der VD-Synthese findet in der Zellmembran epidermaler Keratinozyten und dermaler Fibroblasten statt (Holick *et al.*, 2004). Das in Hepatozyten aus Cholesterol gebildete und über Transportproteine zur Haut transportierte 7-DHC absorbiert UVB-Strahlung ( $\lambda = 290\text{-}315\text{ nm}$ ). Diese absorbierte Energie öffnet in der relativ starren 4-Ring-Struktur des 7-DHC den B-Ring, was zum rotationslabilen Provitamin D<sub>3</sub> führt. Dieses wird in einem wärmeabhängigen Prozess durch schnelle Isomerisierung zum thermodynamisch stabilen VD<sub>3</sub> umgewandelt (Holick *et al.*, 2004; Kitson *et al.*, 2012). Eine Intoxikation mit Provitamin D<sub>3</sub> und VD<sub>3</sub> durch übermäßige Ultraviolett (UV)-Exposition findet nicht statt, da Provitamin D<sub>3</sub> durch weitere Absorption der UV-Strahlung zu verschiedenen Photoprodukten, wie Lumisterol und Tachysterol isomerisiert, die nur geringen Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel nehmen (Holick *et al.*, 2004; Kitson *et al.*, 2012; Bikle *et al.*, 2010). Der erste Aktivierungsschritt wird durch Faktoren wie Hautpigmentierung, Alter, BMI, Hauttemperatur, Jahres- und Tageszeit und den Lichtschuttfaktor aufgetragener Sonnencremes beeinflusst (Holick *et al.*, 2004; Tsiaras *et al.*, 2011).

Das stabile VD<sub>3</sub>, wie auch die anderen VD-Metabolite können von der Haut mithilfe von Transportproteinen – z.B. durch das in Hepatozyten synthetisierte *group-specific component globulin* (Gc-Globulin) – ihre Zielorte erreichen (Gressner *et al.*, 2008; Tsiaras *et al.*, 2011). VD<sub>3</sub> gelangt daraufhin entweder zur Leber oder kann aufgrund seiner Lipidlöslichkeit in Adipozyten aufgenommen und eingelagert werden, wodurch sich seine Halbwertszeit auf ca. zwei Monate verlängert (Tsiaras *et al.*, 2011).

Nutritives VD<sub>2</sub> und VD<sub>3</sub> wird über einen Gallensäure-abhängigen Prozess intestinal durch Enterozyten absorbiert und über den lymphatischen Weg in Chylomikronen zur Leber transportiert. Dort werden sowohl das in der Haut synthetisierte VD<sub>3</sub> als auch das nutritive VD aktiviert: In Leberzellen wie Hepatozyten und HSCs wird das VD mittels 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxyvitamin D (25-VD) hydroxyliert. Bei diesem Enzym handelt es sich um Cytochrom P<sub>450</sub>-Isoformen (mikrosomales CYP2R1 und

mitochondriales CYP27A1) (Kitson *et al.*, 2012). Das biologisch inaktive 25-VD wird aufgrund seiner zwei- bis dreiwöchigen Halbwertszeit und seiner geringen Syntheseregulation als Messparameter für den VD-Status herangezogen (Chiang *et al.*, 2009; Holick *et al.*, 2004; Kitson *et al.*, 2012; Dusso *et al.*, 2005).

Der letzte Aktivierungsschritt erfolgt vorrangig im proximalen Tubulus der Niere, aber zum geringen Teil auch extrarenal in Lymphozyten, Prostata, Colon, Lunge, pankreatischen  $\beta$ -Zellen und im parathyroidalen Gewebe (Kitson *et al.*, 2012; Dusso *et al.*, 2005). Dieser genau regulierte Schritt, welcher zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-VD) führt, wird durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase katalysiert. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine mitochondriale Cytochrom P<sub>450</sub>-abhängige Monooxygenase (CYP27B1). Biologisch aktives 1,25-VD weist eine Halbwertszeit von vier Stunden auf und besitzt die höchste Bindungsaffinität an das Gc-Globulin (Kitson *et al.*, 2012).

Die Inaktivierung und Katabolisierung der VD-Metabolite erfolgt vornehmlich durch die Oxidation ihrer Seitenketten. Der initiale Schritt der Oxidation von 1,25-VD und 25-VD zu 24,25-(OH)<sub>2</sub>-VD erfolgt durch eine Cytochrom-abhängige Monooxygenase – die 25-(OH)-VD-24-Hydroxylase (CYP24A1) (Kitson *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 1989). Nach weiteren Oxidationsschritten, wobei sich mit jeder Oxidation die biologische Aktivität des resultierenden VD-Metaboliten reduziert, entsteht das Endprodukt Calcitronsäure, welche biliär ausgeschieden wird (Reddy *et al.*, 1989).

Angesichts der essentiellen Rolle von 1,25-VD in der Genexpression, dessen Transkripte das zelluläre Wachstum, die Differenzierung von Zellen, das Immunsystem, die Funktion und Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase, sowie die Entwicklung und Erhaltung eines gut mineralisierten Skeletts kontrollieren (Pike *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2012), sind verschiedene Kontrollmechanismen für seine Biosynthese erforderlich. Zu den Faktoren, welche die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase beeinflussen, zählen das Serumphosphat, die Kalziumkonzentration, das Parathormon, der *fibroblast growth factor 23* (FGF 23), Klotho-Genprodukte und die genetischen Polymorphismen des CYP27B1 (Kitson *et al.*, 2012). Bei sinkendem Blutkalziumspiegeln wird die wichtigste Einflussgröße – das Parathormon – gesteigert synthetisiert und sezerniert. Parathormon stimuliert die  $1\alpha$ -Hydroxylase bei gleichzeitiger Synthesehemmung der 24-Hydroxylase. Durch den resultierenden 1,25-VD-Anstieg kommt es zu einem kalzämischen Effekt im Darm und Niere, welcher die Kalziumkonzentration im Blut erhöht (Zierold *et al.*, 1994). Konstitutiv exprimierter FGF 23 reduziert 1,25-VD (Dusso *et al.*, 2005). Ebenfalls konnten in



Klotho *Knock-out*-Mäusen sowohl ein erhöhter VD-Spiegel als auch gesteigerte Serumkonzentrationen von Kalzium und Phosphat nachgewiesen werden, weswegen die Genprodukte von Klotho als negative Regulatoren der 1-Hydroxylase angesehen werden (Dusso *et al.*, 2005). Aber auch 1,25-VD selbst kontrolliert durch seinen negativen Rückkopplungsmechanismus die eigene Biosynthese durch die Inhibition der Synthese und gleichzeitige Steigerung der Expression des CYP24A1 (Zierold *et al.*, 1994; Kitson *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Regulationen wird im menschlichen Organismus der 25-VD-Referenzbereich von 25-50 ng/ml aufrechterhalten und eine Intoxikation (> 150 ng/ml) verhindert (White *et al.*, 2012).

## 1.9 Vitamin D-Wirkungen

Vitamin D bewirkt sowohl „nicht-genomische“ als auch „genomische Effekte“.

Die „nicht-genomischen“ Effekte sind zelluläre Wirkungen, die nicht auf transkriptionaler Ebene stattfinden und nach wenigen Sekunden bis Minuten auftreten. Zwar sind solche Effekte schon lange bekannt, jedoch kann über die zugrundeliegenden Mechanismen, eingebundenen Membranrezeptoren und den möglichen Einfluss des VD-Rezeptors (VDR) nur wenig gesagt werden. In Zellen verschiedener Gewebe wie Darm, Lunge und Niere und in Osteoblasten konnte der VDR in Caveolae der Plasmamembran detektiert werden; er bindet effektiv das 1,25-VD und kann kurzzeitige intrazelluläre Effekte hervorrufen (Zuniga *et al.*, 2011). Allerdings wurden sowohl in VDR<sup>-/-</sup> als auch in VDR<sup>+/+</sup> Osteoblasten die gleichen VD-Effekte beobachtet (Zuniga *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde in Osteoblasten VD-Effekte durch eine Interaktion sowohl mit dem Membranrezeptor *1,25-VD membran-associated rapid-response steroid-binding protein* (1,25-VD MARRS) (Zuniga *et al.*, 2011; Dusso *et al.*, 2005) als auch mit dem *Protein disulfide isomerase family A member 3* (PDIA3) nachgewiesen (Chen *et al.*, 2010). Der VD-Membranrezeptor 1,25-VD MARRS rief nach seiner Klonierung in Hühner-Duodenumzellen und Bindung des 1,25-VD<sub>3</sub> an den Rezeptor eine Stimulation der Phosphataufnahme in die Zellen hervor (Zuniga *et al.*, 2011; Dusso *et al.*, 2005). Durch VD wird der intrazelluläre Kalziumspiegel mittels Kalzium-Influx aus der extrazellulären Matrix durch spannungsabhängige Kanäle erhöht (Lieberherr *et al.*, 1987; Campell *et al.*, 2010). VD-vermittelt werden *second messenger* induziert und kalziumabhängige und -unabhängige zytosolische Kinasen – wie die Proteinkinase C, die *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf)-Kinase (Lissoos *et al.*, 1993; Dusso *et al.*, 2005), und die Proteinkinase A – in Enterozyten (Campbell *et al.*, 2010) aktiviert. In Chondrozyten verändert VD die Membranlipid-Umsetzung, die

Prostaglandin-Produktion und die Proteaseaktivität, welche zur Modifikation des Knochengrundgerüsts und der Kalzifikation führt (Dusso *et al.*, 2005).

Die „genomischen Effekte“ erfordern die Veränderung der Gentranskription und Proteinsynthese durch Interaktion des VD mit seinem intrazellulären Rezeptor, dem VDR. Die VD-Wirkung auf die Gentranskription ist zellspezifisch. Verschiedene VD-Derivate beeinflussen zahlreiche Zellfunktionen innerhalb der verschiedenen physiologischen Systeme.

- a) Als Beispiele für wichtige Wirkungen von VD-Derivaten auf die Leber verhinderte eine VD-Supplementierung in präklinischen Studien die Entwicklung einer Leberfibrose (Kitson *et al.*, 2012; Abramovitch *et al.*, 2011), verbesserte das histologische Erscheinungsbild der Leber bei NAFLD (Kitson *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2011) und senkte das Risiko der Abstoßung von Lebertransplantaten (Kitson *et al.*, 2012; Bitetto *et al.*, 2010). Ebenfalls inhibiert VD dosisabhängig die *in vitro*-Replikation des Hepatitis C-Virus' (HCV) und ermöglicht eine anhaltendere antivirale Antwort (Matsumara *et al.*, 2012; Yano *et al.*, 2007; Abu-Mouch *et al.*, 2011; Nimer *et al.*, 2012, Bitetto *et al.*, 2011; Gal-Tanamy *et al.*, 2011). In Leberkrebszellen konnte durch die Aktivierung des VDR mittels VD oder pharmakologischer VDR-Agonisten eine Inhibition der Proliferation der Tumorzellen erzielt werden (Zuniga *et al.*, 2011; Fingas *et al.*, 2013).
- b) Im Immunsystem wirken VD-Derivate besonders vielschichtig: So regulieren sie die Differenzierung und funktionelle Reifung Antigen-präsentierender Zellen als der fundamentalsten Zellklasse der angeborenen und erworbenen Immunität (Gieseler *et al.*, 1991; Gieseler *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 2011; White *et al.*, 2012), beeinflussen die Differenzierung, Funktion und Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen (Kitson *et al.*, 2012), die monozytäre Synthese und Freisetzung von Zytokinen (Gruber *et al.*, 2008), fördern die Produktion und Funktion Regulatorischer T-Zellen (White *et al.*, 2012) und verbessern die B-Zell-Funktion (Roth *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe von Zarrabeitia *et al.* (1992) konnte in isolierten und Lipopolysaccharid-stimulierten mononukleären Zellen die hemmende Wirkung von 1,25-VD auf die Produktion von TNF $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und IL-6 nachweisen.
- c) Zu weiteren nicht hepatischen VD-Wirkungen zählen die Induktion der Osteoblastenreifung (Holick *et al.*, 2007), die Transkriptionsaktivierung von Insulingenen (Pittas *et al.*, 2007) und die Senkung des spezifischen weiblichen

Risikos, Multiple Sklerose (Munger *et al.*, 2004) sowie des kindlichen Risikos, Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln (Hypponen *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass VD im Menschen FGF 19 aktiviert, was sich durch dessen hemmende Wirkung auf das *Forkhead box protein O 1* (FOXO 1)-PI-3-Kinase-Signalmolekül positiv auf den Glukosemetabolismus und die Insulinresistenz auswirkt (Geier *et al.*, 2011). Zusätzlich kontrolliert VD in der Epidermis die Keratinozytendifferenzierung, die Barrierefunktion, die Talgdrüsenentwicklung und den postnatalen Haarfollikelzyklus – und es ist in glatten Muskelzellen und im kardiovaskulären System für den normalen Blutfluss und die kardiovaskuläre Integrität verantwortlich (Pike *et al.*, 2012).

Auch im pathologischen Kontext neoplastischer Erkrankungen konnte mittels VD-Supplementation eine Inhibition der Leukämiezellproliferation, eine Ausdifferenzierung Tumor-assoziiierter Makrophagen (Tanaka *et al.*, 1982) sowie ein vermindertes Risiko, ein Colon-, Mamma- oder Prostata-Karzinom oder ein Non-Hodgkin-Lymphom zu entwickeln, bewirkt werden (Kitson *et al.*, 2012). Die Suppression des Zellwachstums kann durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Induktion der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p 21 oder p 27 und Inhibition der TGF- $\alpha$ /epidermal growth factor receptor (EGFR)-Überexpression, erzielt werden (Dusso *et al.*, 2005; Haussler *et al.*, 2011). Ebenso führte eine Behandlung von Krebszellen mit 1,25-VD zur Apoptose-Induktion durch Anstieg der proapoptotischen Proteine *Bcl-2-associated X protein* (Bax) und *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), sowie Repression des apoptotischen Proteins *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) (Ylikomi *et al.*, 2002; Haussler *et al.*, 2011).

## **1.10 VDR, Signalweg und einzelne Nukleotid Polymorphismen (SNP)**

### **1.10.1 VDR**

Der nukleäre VD-Rezeptor ist ein Liganden-induzierter Transkriptionsfaktor. Die von Baker *et al.* (1988) klonierte humane VDR cDNA konnte von Miyamoto *et al.* (1997) erstmals in ihrer genomischen Struktur beschrieben werden. Das für den menschlichen VDR kodierende Gen wurde 1992 auf dem langen Arm des Chromosoms 12 in der Region 12q13 lokalisiert (Uitterlinden *et al.*, 2004). Das aus >1.000 Basenpaaren bestehende Gen setzt sich aus neun Exons und einer ausgeprägten Promotorregion zusammen und kodiert für 427 Aminosäuren (Haussler *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012; Falletti *et al.*, 2010; Uitterlinden *et al.*, 2004; Adorini *et al.*, 2009). Das 48 kDa große, lösliche Protein des nukleären VD-Rezeptors umfasst als Strukturelemente die

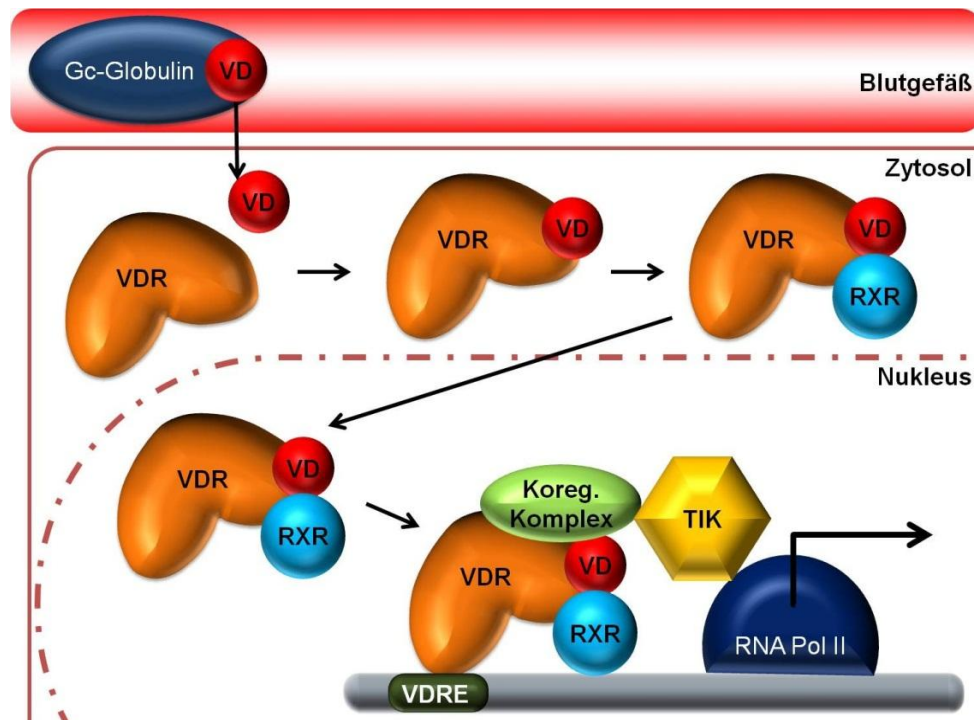
hochkonservierte N-terminale Bindungsdomäne und die multifunktionale C-terminale Ligandenbindungsdomäne, die sowohl für die Ligandenbindung, die Retinoid X-Rezeptor (RXR)-Heterodimerisierung als auch für die Bindung des koregulatorischen Komplexes verantwortlich ist (Pike *et al.*, 2012; Kitson *et al.*, 2012; Adorini *et al.*, 2009; Haussler *et al.*, 2008).

### 1.10.2 VDR-Signalweg

Bezüglich der Liganden-abhängigen Induzierbarkeit des VDR hat VD die höchste Affinität. Andere Liganden, wie zum Beispiel Lithocholsäure oder Retinoide, binden mit geringerer Affinität und induzieren ebenfalls die Signalkaskade (Falleti *et al.*, 2010; Haussler *et al.*, 2008).

Nach Bindung des Liganden am C-terminalen Ende folgt die Heterodimerisierung des VDR. Vorrangig findet dies mit den drei Isoformen des nukleären RXR statt (Campbell *et al.*, 2010), welcher an die Interaktionsoberfläche der C-terminalen Region des VDR bindet. Neben der Heterodimerisierung bildet die Konformationsänderung des VDR einen weiteren wichtigen Schritt in der VDR-Signalkaskade. Die hierdurch beeinflusste Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF2)-Domäne erlaubt die Rekrutierung des koregulatorischen Komplexes und des Transkriptions-Initiations-Komplexes (Dusso *et al.*, 2005; Haussler *et al.*, 2008). Zusätzlich demaskiert die Änderung der VDR-Konformation in der AF2-Domäne die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungstasche (Campbell *et al.*, 2010). Daraufhin transloziert der VDR-Komplex in den Zellkern. Die Genexpression wird indirekt über die Rekrutierung verschiedener koregulatorischer Faktoren moduliert.

Mittels der zwei, im N-terminalen Ende befindlichen, hoch konservierten Zinkfingerdomänen kommt es zur Erkennung und Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen in den Promotorregionen der VDR-Zielgene (*vitamin D response elements*; VDRE). Nach Bindung des VDR-RXR-Komplexes an das VDRE kann es sowohl zur Hemmung als auch zur Initiation der Genexpression kommen (Dusso *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2010): Während bei der Initiation ein Koaktivatorkomplex [z.B. *steroid receptor coactivator-1* (SRC1); *CREB1-binding protein* (CBP/P300); *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3* (RAC3)] mit Histonacetyltransferase-Aktivität als Koregulator benötigt wird, bewirken Korepressoren [z.B. *nuclear receptor co-repressor* (NcoR); *silencing mediator for retinoid or thyroid hormone receptors* (SMRT)] mit ihrer Histondeacetylase-Aktivität eine Inhibition der Genexpression, wenn eine Bindung an negative VDREs erfolgt (Dusso *et al.*, 2005; Haussler *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: VDR-Signalweg.**

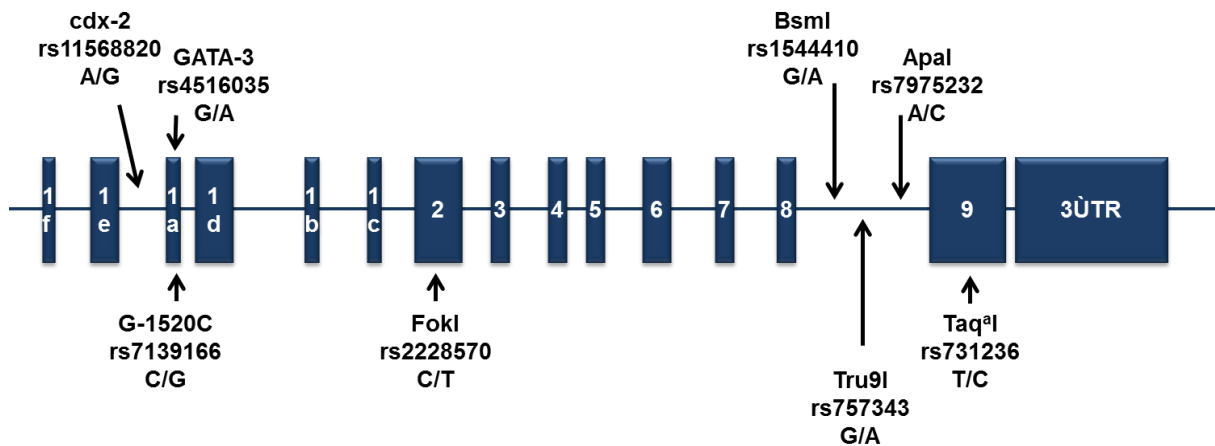
Schematische Darstellung der durch die VD-Bindung ausgelösten VDR-Signalkaskade mit Aktivierung der Transkription. In diesem Fall besteht der koregulatorische Komplex aus Koaktivatoren. VD = Vitamin D, VDR = VD-Rezeptor, RXR = Retinoid X-Rezeptor, TIK = Transkriptions-Initiations-Komplex, RNA-Pol II = RNA-Polymerase II, Koreg. = koregulatorisch, VDRE = *vitamin D response elements* (in Anlehnung an Dusso *et al.*, 2005 und Haussler *et al.*, 2008)

Mutationen in den Zinkfinger-DNA-Bindungsmotiven können sich über eine gestörte Bindung des Komplexes mit VDRE klinisch relevant auswirken (Dusso *et al.*, 2005). Ebenso führen eine Verschiebung des Leserasters bei der VDR-Translation, ein frühzeitiges Stop-Codon oder eine falsche posttranskriptionale Modifikation zu einer funktionell insuffizienten VDR-Signalkaskade (Campbell *et al.*, 2010).

### 1.10.3 VDR-SNPs

Infolge der weitgehenden Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Venter *et al.*, 2001) ist eine Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphism*; SNP) möglich. Diese kurzen Sequenzen, welche sich in der Normalbevölkerung interindividuell unterscheiden können, machen den größten Teil an DNA-Varianzen aus. Von einem „SNP“ spricht man per Definition erst dann, wenn das am wenigsten vorkommende Allel mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 1% in der Normalbevölkerung auftritt (Alberts *et al.*, 2005). SNPs sind nicht nur im Promotorbereich, sondern auch in Exons und Introns lokalisiert.

In einer Vielzahl von Studien konnte nachgewiesen werden, dass – unabhängig vom VD – Änderungen im VDR an einer Vielzahl von Erkrankungen, wie der primären biliären Zirrhose, Autoimmunerkrankungen und verschiedenen Infektionserkrankungen (z.B. Tuberkulose, Psoriasis, Lepra), beteiligt sind (Geier *et al.*, 2011; Kitson *et al.*, 2012).



**Abbildung 5: VDR-Struktur mit den einzelnen SNP.**

Schematischer Aufbau des VDR mit der der jeweiligen Lokalisation des in der Arbeit untersuchten SNP. Angegeben wurde zusätzlich die Identifikationsnummer (rs-Nummerr.). (modifiziert nach Wjst *et al.* 2005)

Änderungen des VDRs können hierbei durch Veränderungen einzelner Nukleotide im VDR-Genom erfolgen (siehe Abbildung 5). Die Anzahl der möglichen Polymorphismen wird in der Literatur sehr unterschiedlich beziffert. Durch den SNP *Caudal Type Homeobox 2* (Cdx2; rs11568820) - von Arai *et al.* (2001) charakterisiert - in der 1A-Promotorregion konnte gezeigt werden, dass ein Nukleotidaustausch von Adenosin (A) zu Guanin (G) die Cdx2-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle eliminiert und somit die Effizienz der VDR-Transkription herunterreguliert (Ochs-Balcom *et al.*, 2008; Uitterlinden *et al.*, 2004). Ein SNP in der 3' *untranslated region* (UTR) wirkt sich auf die Stabilität und die Degradation der mRNA aus. Beispiele hierfür sind die SNPs BsmI (rs1544410) (Morrison *et al.*, 1992), Taq<sup>I</sup> (rs731236) (Morrison *et al.*, 1994), ApaI (rs7975232) (Faraco *et al.*, 1989) und Tru9I (rs757343) (Ye *et al.*, 2000). Des Weiteren können auch SNPs im Bereich des Exons lokalisiert sein. Zu erwähnen ist an dieser Stelle der SNP FokI (rs2228570), der sich im Exon 2 befindet. Hierbei entsteht durch den Nukleotidaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) stromaufwärts des normalen Startcodons ein neues ATG-Translationsstartcodon. Dies hat zur Folge, dass ein drei Aminosäuren längeres Protein translatiert wird, welches im

Vergleich zur kürzeren Version eine geringere transkriptionale Aktivität aufweist (Halsall *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

Verschiedene Untersuchungen demonstrierten eine Assoziation von VDR-SNPs mit dem Auftreten von Adeno-Karzinomen in Colon, Mamma und Prostata (Kitson *et al.*, 2012). In Patienten mit chronischer Hepatitis C ist der CC-Genotyp im Apal-SNP mit einer rapiden Fibroseprogression, einer Zirrhose und einer gesteigerten MMP 9-Expression assoziiert (Kitson *et al.*, 2012). Bei Patienten mit Hepatitis B konnte gezeigt werden, dass Variationen in der Allelfrequenz Apal und im geringen Maße von Taq<sup>a</sup>I mit einer höheren Viruslast, schwereren Fibrose und stärkeren Nekro-Inflammation verbunden ist (Kitson *et al.*, 2012). Wie bei Falletti *et al.* (2010) erwähnt, existieren kontroverse Studienergebnisse bei der Assoziation von VDR-SNPs mit dem Auftreten einer primären biliären Zirrhose oder einer Autoimmunhepatitis. Bei Patienten mit Leberzirrhose korrelieren SNPs mit der Ätiologie (virale vs. alkoholinduzierte Leberzirrhose). Zusätzlich konnte bei Patienten mit einem HCC und einer Leberzirrhose eine Assoziation im BsmI- und TaqI-SNP dargestellt werden (Falletti *et al.*, 2010).

Mögliche Zusammenhänge der VD-Wirkung in kultivierten primären humane hepatischen Sternzellen (pHSC) mit VDR-SNPs konnten der Literatur nicht entnommen werden.

### **1.11 Zielsetzung der Arbeit**

In den Industrieländern ist die NAFLD mit hoher Inzidenz eine der Hauptursachen der Leberfibrose. Wie bereits erwähnt, kommt es bei der NAFLD im Rahmen des metabolischen Syndroms aufgrund eines gestörten Fett- und Triglyzeridmetabolismus' zur gesteigerten Fettakkumulation in Hepatozyten. Zusätzlich ist bei NAFLD-Patienten ein Defizit an VD bekannt (Rhee *et al.*, 2012; Barchetta *et al.*, 2011; Kwok *et al.*, 2013). Während der genaue Pathomechanismus der Entstehung der NAFLD kontrovers diskutiert wird, besteht Übereinstimmung darin, dass der Progress von der NAFL über die NASH bis hin zur Leberzirrhose durch stete Inflammation, oxidativen Stress und hepatozelluläre Schädigungen bedingt ist.

Im Vergleich zu Patienten mit einfacher Steatose, werden bei NASH-Patienten erhöhte Serumparameter [ALT, Aspartat-Aminotransferase (AST)] sowie verstärkte Lipidperoxidation, TGF- $\beta$ -mRNA-Expression, HSC-Aktivierung und Kollagen-Ablagerung beobachtet (Tsukada *et al.*, 2006). Da HSCs am Progress der Fibrose und der

Aufrechterhaltung der Inflammation maßgeblich beteiligt sind, gilt diesen das besondere Augenmerk.

Im Besonderen wurden in dieser Arbeit folgende Fragen geklärt:

- Wie verhalten sich unterschiedliche ausgesuchte Serumparameter (ALT; AST; FFA; VD) in Abhängigkeit vom Schweregrad der NAFLD?
- Welche Auswirkungen hat der Schweregrad der NAFLD bei bariatrischen Chirurgie-Patienten auf die Expression von VDR und ausgewählter profibrotischer Faktoren?
- Welche Wirkungen hat die Aufnahme von FFAs in pHSCs im Hinblick auf die Proinflammation und -fibrose?
- Kann VD die FFA induzierten Auswirkungen auf pHSCs modulieren?
- Bewirkt die Stimulation von pHSCs mit TGF- $\beta$  eine proinflammatorische und profibrotische Reaktion und wie wirkt sich die zusätzliche Gabe von VD aus?
- Spielt der VDR eine Rolle in der TGF- $\beta$ -vermittelten proinflammatorischen bzw. profibrotischen Antwort?
- Welche nicht genomischen Veränderungen bewirkt VD in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSCs?
- Beeinflussen bestimmte VDR-SNPs die VD-Wirkung?

Zunächst sollte eruiert werden, ob die hier ermittelten Ergebnisse im Kollektiv der bariatrischen Chirurgie-Patienten auch in einem *in vitro*-Modell mit isolierten humanen hepatischen Sternzellen reflektiert werden. Hierfür musste zunächst ein Verfahren zur Isolation der pHSC etabliert werden. Es sollte untersucht werden, ob FFAs neben ihrer bekannten Schädigung der Hepatozyten auch die pHSC-Aktivierung beeinflussen. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob und ggf. in wiefern VD die pHSC-Aktivierung beeinflusst. Ferner sollte mittels siRNA-vermitteltem VDR-*Knock-down* dessen Einfluss auf die proinflammatorische und -fibrotische Antwort der pHSCs näher untersucht werden. Zusätzlich wurden die kurzfristigen Wirkungen von VD und deren Auswirkungen auf den TGF- $\beta$ -Signalweg analysiert.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenmaterial

Für *ex vivo*-Untersuchungen an einer Patientenruppe mit NAFLD dienten Leberbiopsien und Patientenserum sowohl von  $n = 82$  morbid adipösen NAFLD-Patienten als auch von  $n = 10$  Kontrollen. Die Patienten (Altersbereich: 18–65 Jahre) wurden anamnestiziert, körperlich, laborchemisch und sonographisch untersucht (Ausschlusskriterien: Chronische Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, genetische Defekte, immunsuppressive oder zytotoxische Therapien, vorangegangene Organtransplantationen, Malignitäten in den letzten fünf Jahren sowie Alkohol- und/oder Drogenabusus). Die Indikation für eine bariatrische Operation erfolgte nach den Richtlinien des *National Institutes of Health* (z.B.  $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/cm}^2$ , oder  $\geq 35 \text{ kg/cm}^2$  plus Ko-Morbiditäten). Alle Patienten wurden zu den zusätzlichen Risiken einer Leberbiopsie während des Eingriffes aufgeklärt und darüber informiert, dass die Leberbiopsien und Blutserum für Forschungszwecke verwendet werden würden. Sie hatten ihr schriftliches Einverständnis erteilt (Ethikantrag mit AZ: 06-3049).

Das Lebergewebe für die Isolation verschiedener primärer Leberzellspezies wurde unserer Arbeitsgruppe von den Chirurgen der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie (UK Essen) im Rahmen von Leberteilresektionen und Lebertransplantationen zur Verfügung gestellt. Das schriftliche Einverständnis des jeweiligen Patienten zur Verwendung des entnommenen Lebergewebes zu Forschungszwecken wurde vorausgesetzt (Ethikantrag mit AZ: 09-4252).

Die Veröffentlichung der gewonnenen Patientenmaterialien und analysierten Daten erfolgt anonymisiert. Standard für alle Vorgehensweisen war die revidierte Deklaration von Helsinki (Edinburgh, Oktober 2000), die durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Essen bestätigt wurde.

#### 2.1.2 Substanzen und Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Propanolol (Isopropanolol), molecular grade (mind. 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Agarose (Ultrapure)	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V (fatty acid-free)	Roche Diagnostics; Indianapolis, USA

Anti-CD133 Micro Beads	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
Aqua Braun (steriles pyrogenfreies Wasser)	B.Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Azeton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7	PAA; Pasching, Österreich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ), Dihydrat (99%, p.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Chloroform (mit Amylenen als Stabilisatoren, mind. 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail-Tabletten	Roche; Grenzbach, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser	Ambion/Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Direct Red 80Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Direct Red 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Etylendiaminotetraacetat (EDTA) (99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA) (97%), RNase-, DNase- und Proteinase-frei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ergocalciferol	Biomol; Hamburg, Deutschland
Essigsäure (99,8%, p.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland

Ethanol absolut (99,9%, p.a.)	Riedel-de-Haën; Seelze, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl-Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Externe Well Factor Solution	BioRad; München, Deutschland
Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Gelbeladungspuffer für DNA, 6x	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Gene Ruler, 1000 bp, "DNA-Leiter"	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Gene Ruler, untere Bereich "DNA-Leiter"	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Gentamicin (10 mg/ml)	PAA; Pasching, Österreich
Glycin, Elektrophoresis-grade	MP Biomedicals; Eschwege, Deutschland
Hank's balanced salt solution (HBSS), 1x ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ , ohne Phenolrot	PAA; Pasching, Österreich
Salzsäure (HCl), 10%	Carl-Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (1 M)	PAA; Pasching, Österreich
Histoacryl-Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Immersol 518F (Öl: Fluoreszenzmikroskopie)	Zeiss; Jena, Deutschland
Lane Marker Sample Buffers (Probenpuffer für Bahnmarker)	Thermo Scientific; Bonn, Deutschland
Lipofectamin-RNAiMAX	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)-Puffer	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
Mayers Hämalaun	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Methanol	Riedel-de-Haën; Seelze, Deutschland
Natriumorthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	GERBU Biotechnik GmbH; Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs (NEB)-Puffer	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland

Nile Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Non-fat dry milk powder (Magermilchpulver)	Applichem; Darmstadt, Deutschland
NuPAGE-MES SDS-Laufpuffer (20 x)	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
NuPAGE-Transferpuffer (20 x)	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Nyco Prep	Progen Biotechnik; Heidelberg, Deutschland
Oleat, Zellkultur-getestet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
PageRuler, vorgefärbte „Protein-Leiter“	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Palmitoleat, Zellkultur-getestet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung 4%, methanolfrei	Carl-Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
PBS (Dulbecco´s Phosphat-gepufferte Saline 1x, ohne MgCl <sub>2</sub> & CaCl <sub>2</sub> )	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
PhosphoSTOP-Phosphatase-Inhibitor Cocktail-Tabletten	Roche; Grenzach, Deutschland
Pikrinsäure	Applichem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (pMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Provitro; Berlin Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
ProLong Gold antifade-Reagenz mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)- Puffer (10x)	Cell Signaling Technology; Boston, USA
RNA-Later	Ambion / Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Rnase ZapWipes	Ambion / Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS), ultrarein	MP Biomedicals; Eschwege, Deutschland

Shandon Xylen-Substitut	Thermo Scientific; Bonn, Deutschland
TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x)	Gibco; Karlsruhe, Deutschland
TGF- $\beta$ RI Kinase Inhibitor, LY-364947	Calbiochem Merck; Nottingham, United Kingdom
TGF- $\beta_1$ , human, rekombinant	PeproTech; Hamburg, Deutschland
Topvision Agarose	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Trichloracetat (10%, p.a.)	Carl-Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (99%)	Carl-Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	MP Biomedicals; Eschwege, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
TRIzol-Reagenz	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA, 100x	PAA; Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

1 mL-Einwegspritzen	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
15 mL- und 50 mL-Röhrchen	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
25 $\mu$ m- und 40 $\mu$ m-PharmAssure Sterilfilter	Pall medical GmbH; Dreieich, Deutschland
Adhäsive Verschlussfolien für PCR-Platten	Nerbe plus GmbH; Winsen/Luhe, Deutschland
BD Microlance 3 (27Gx $\frac{3}{4}$ , 20Gx1 $\frac{1}{2}$ )- Einwegkanülen	Becton Dickinson/BD Biosciences; Fraga, Spanien
Biocoat-Platten, 6-Well	Becton Dickinson/BD Biosciences; Erembodegen, Belgien
Combitips plus 0,5 mL, 5 mL, 10 mL	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Deckgläschen (24 x24 mm, 24 x 60 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; Edermünde, Deutschland
Einwegskalpelle	Servoprax® GmbH; Wesel, Deutschland
Hard-Shell PCR-Platten 96-well	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Metallsiebe, Maschenweite 60 mesh	Sigma-Aldrich-Inc.; Saint-Louis, USA
Microseat `B`seat Verschlussfolie	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland
Nunc Cryotube-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland
NuPAGE 4-12% Bis-Tris SDS Page Gel	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, USA
PCR-Platten, PP Natur, 96-Well	Nerbe plus GmbH; Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen für Zellkultur (10 mm, 16 mm)	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen: 0,1–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	GE Healthcare; Freiburg, Deutschland
PVDF-Membran Immobilon-P (Porengröße 0,45 µm)	Millipore; Eschborn, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße: 0,5, 1,5 und 2 mL	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Serologische Cellstar-Einwegpipetten: 2, 5, 10, 25 und 50 mL	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Tissue Ruptor Disposable Probes, nonsteril	Qiagen; Hilden, Deutschland
Vasofix Safety-Venenverweilkatheter	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman International Ltd.; Maidston, United Kingdom
Zellkulturflaschen: 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24- und 96-Well	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
<b>2.1.4 Geräte</b>	
AMG Mikroskop Evos XL Core	Axon Lab AG; Baden-Dättwil, Schweiz
Autoklav 2540	EL Systec GmbH; Wettenberg, Deutschland
Autoklav Systec VX-150	EL Systec GmbH; Wettenberg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus; Hanau, Deutschland
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reader LAMBDA E	MWG-Biotech; Ebersberg, Deutschland
Feinwaage AT261 Delta Range	Mettler Toledo; Gießen, Deutschland
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH; Garching, Deutschland
iCycler iQ	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
LaminAir Sterilwerkbank, (verwendet für Zellkulturlinie)	Heraeus; Hanau, Deutschland
LAS-3000	Fuji Film Eurpoe; Düsseldorf, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Zeiss; Jena, Deutschland
MACS LS-Säule	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland
Netzteile PowerPac 300 und PowerPac HD	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Peqlab E-Box VX2	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
Peristaltikpumpe Masterflex easy-load II	Cole Parmer Instrument Company; Vernon Hills, USA
pH-Meter 765	Calimatic Knick; Berlin, Deutschland

Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG; Schwabach, Deutschland
Sterilbank Biological Safety Cabinet Class II (zur Isolation der Primärzellen)	NuAire; Plymouth, USA
Tissue Ruptor	Qiagen; Hilden, Deutschland
Ultra-Turrax Dispergiergerät	IKA; Staufen, Deutschland
VapoProtect Cyclor	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Waage ABT 120-50M	Kern & Sohn GmbH; Balingen, Deutschland
Wasserbäder GLF und Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH; Seelbach, Deutschland
Zentrifugen 5424R, 5810R und 5415R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

## 2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium / Zusatz	Hersteller
DMEM/HAM's F12	PAA; Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (high glucose)	PAA; Pasching, Österreich
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Supplement	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS) for Stellate Cell	Provitro; Berlin, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), PAA Clone, ultra-low Endotoxin-free	PAA; Pasching, Österreich
L-Glutamin (200 mM)	PAA; Pasching, Österreich
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA; Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin Solution for Stellate Cells	Provitro; Berlin, Deutschland
Stellate Cell Growth Supplement	Provitro; Berlin, Deutschland
Stellate Cell Medium	Provitro; Berlin, Deutschland

### 2.1.5.1 Zusammensetzung HSC-Wachstumsmedium

Medium für HSC (Stellate Cell Medium)	500 mL
Wachstumszusätze für HSC (Stellate Cell Growth Supplement)	5 mL
Penicillin/Streptomycin Solution für HSC	5 mL
FBS für HSC	10 mL



### 2.1.5.2 Zusammensetzung Hepatozyten-Zellkulturmedium

DMEM/Ham's F12 Medium	500 mL
Hitzeinaktiviertes FCS (56°C, 30 min)	50 mL
10000 U/mL Penicillin/ 10 mg/mL Streptomycin	5 mL
200 mM L-Glutamin	5 mL

### 2.1.5.3 Zusammensetzung Kupffer-Zell-Wachstumsmedium

DMEM (4,5 g/L Glukose)	500 ml
Hitzeinaktiviertes FCS	50 ml
10000 U/mL Penicillin/ 10 mg/mL Streptomycin	5 ml
200 mM L-Glutamin	5 ml

### 2.1.5.4 Zusammensetzung Endothelzell-Wachstumsmedium

Endothelzellmedium	500 mL
Hitzeinaktiviertes FCS	5 mL
10000 U/mL Penicillin/ 10 mg/mL Streptomycin	5 mL

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primärantikörper für Western Blots

Antikörper	Spezifität (Klon)	Spezies	Größe [kDa]	Firma
Anti-Col1α1	Polyklonal	Schaf	140	R&D; Minneapolis, USA
Anti- <i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i> (Erk)	Polyklonal	Kaninchen	42/44	Santa Cruz Biotech- nology; Heidelberg, Deutschland
Anti-Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydro- genase (GAPDH)	Monoklonal (14C10)	Kaninchen	37	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti- <i>heat shock protein</i> (HSP) 90	Monoklonal (16F1)	Ratte	83	Stressgen; Kampenhout, Belgien
Anti-p-Erk	Monoklonal (197G2)	Kaninchen	42/44	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-pSmad2 (Ser465/467)	Polyklonal	Kaninchen	60	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-pSmad3 (Ser423/425)	Monoklonal (C25A9)	Kaninchen	52	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland

Anti-Smad2	Monoklonal (86F7)	Kaninchen	60	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-Smad3	Monoklonal (C67H9)	Kaninchen	52	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-Smad4	Polyklonal	Kaninchen	70	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-Smad7	Monoklonal (293039)	Maus	46	R&D; Minneapolis, USA
Anti-Smurf2	Monoklonal (690638)	Maus	86	R&D; Minneapolis, USA
Anti-TATA-binding protein (TBP)	Polyklonal	Kaninchen	38	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-TGF- $\beta$	Polyklonal	Kaninchen	12, 25 45-65	Cell Signaling; Frankfurt Main, Deutschland
Anti-VDR	Monoklonal (9A7)	Ratte	48	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti- $\alpha$ -SMA	Polyklonal	Ziege	42	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Anti- $\beta$ -Aktin	Monoklonal (C4)	Huhn	42	Santa Cruz Biotech- nology; Heidelberg, Deutschland

#### 2.1.6.2 Primärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse

Antikörper	Spezifität (Klon)	Spezies	Hersteller
Anti- $\alpha$ -SMA x Fluores- cein isothiocyanat (FITC)	Monoklonal (1A4)	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Anti-IgG2a x FITC (Isotyp-Kontrolle)	Monoklonal (UPC-10)	Murine Myeloma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Anti-Albumin	Monoklonal (1888835)	Maus	R&D; Minneapolis, USA
Anti-CD146 x FITC	Monoklonal (541-10B2)		Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland

Anti-IgG1 x FITC (Isotypkontrolle)	Monoklonal Maus (IS5-21F5)	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD 163 x APC (Allophycocyanin)	Monoklonal Maus (215927)	R&D; Minneapolis, USA
Anti-IgG1 x APC (Isotypkontrolle)	Monoklonal Maus (11711)	R&D; Minneapolis, USA

### 2.1.6.3 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-goat IgG- Meerrettichperoxidase (= <i>Horseradish peroxidase</i> ; HRP)	Esel	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland
Anti-mouse IgG <sub>2A</sub> -APC	Ratte	R&D; Minneapolis, USA Santa Cruz Biotechnology;
Anti-mouse IgG-HRP	Ziege	Heidelberg, Deutschland Santa Cruz Biotechnology;
Anti-rabbit IgG-HRP	Ziege	Heidelberg, Deutschland Santa Cruz Biotechnology;
Anti-rat IgG-HRP	Ziege	Heidelberg, Deutschland Santa Cruz Biotechnology;
Anti-sheep IgG-HRP	Esel	Heidelberg, Deutschland

### 2.1.7 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
HotStar Taq-Polymerase	Qiagen; Hilden, Deutschland
Kollagenase Typ V aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Restriktionsenzym HpyCH4III	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym FokI	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym BsmI	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym EcoRV	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym NlaIII	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym Taq <sup>a</sup> I	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym ApaI	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym DdeI	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsenzym MseI	New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland

### 2.1.8 Oligonukleotide für die PCR

Col1 $\alpha$  human (NM\_000088)

Col1 $\alpha$  forward      5'-AAC AGC CGC TTC ACC TAC AG-3'

Col1 $\alpha$  reverse      5'-GGA GGT CTT GGT GGT TTG GT-3'

Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) human (NM\_000194)

HPRT forward      5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT-3'

HPRT reverse      5'-CTT GCG ACC TTG ACC ATC TT-3'

TGF- $\beta$  human (NM\_000660)

TGF- $\beta$  forward      5'-GTA CCT GAA CCC GTG TTG CT-3'

TGF- $\beta$  reverse      5'-GAA CCC GTT GAT GTC CAC TT-3'

$\alpha$ -SMA human (NM\_001613)

$\alpha$ -SMA forward      5'-TTC GTT ACT ACT GCT GAG CGT GAG A-3'

$\alpha$ -SMA reverse      5'-AAG GAT GGC TGG AAC AGG GTC-3'

PDGF human (NM\_002608)

PDGF forward      5'-AGA CCC CGG AGA GGA AGA T-3'

PDGF reverse      5'-GGA ACC CAG GGT CCT TCT T-3'

VDR human (NM\_000376)

VDR forward      5'-GAC CTG TGG CAA CCA AGA CT-3'

VDR reverse      5'-GAA CTT GAT GAG GGG CTC AA-3'

MCP-1 human (NM\_002982)

MCP-1 forward      5'-AGC AAG TGT CCC AAA GAA GC-3'

MCP-1 reverse      5'-TGG AAT CCT GAA CCC ACT TC-3'

FN human (NM 212482)

FN forward      5'- CCA TCA TCC CAG AGG TGC CCC A-3'

FN reverse      5'- GGA AGA GTT TAG CGG GGT CCA CC-3'

CYP2R1 human (NM\_024514)

CYP2R1 forward 5'-GCC AGG TGT ACG GAG AGA TCT TCA-3'

CYP2R1 reverse 5'-GTG ATC AAC CCA TCC TCG GCC-3'

**Primer bzw. siRNA (Kat.-Nr.)**

**Hersteller**

Human Tek2 Primer (QT01666322)

Qiagen: Hilden, Deutschland

Human CD 163 Primer (QT00074641)

Qiagen: Hilden, Deutschland

Human ApoB Primer (QT00020139)

Qiagen: Hilden, Deutschland

Human VDR siRNA (SI03649177)

Qiagen: Hilden, Deutschland

Human ns siRNA (1022076)

Qiagen: Hilden, Deutschland

**2.1.9 Kits**

**Bezeichnung**

**Hersteller**

Amersham *electrogenerated chemiluminescence* (ECL) Plus Western Blotting Detection Reagent

GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland

*bicinchoninic acid* (BCA) Protein Assay Kit

Pierce/Thermo Scientific; Bonn, Deutschland

M30 Apoptosense ELISA Kit

Peviva; Bromma, Schweden

QuantiTect Reverse Transcription Kit

Qiagen; Hilden, Deutschland

QuantiTect SYBR Green Polymerase Chain Reaction (PCR) Kit

Qiagen; Hilden, Deutschland

RNeasy Mini Kit

Qiagen; Hilden, Deutschland

Nuclear Extraction Kit

OriGene; Belrose, Australien

25-Hydroxy-Vitamin D *enzyme immunoassay* (EIA)

Immunodiagnostic System GmbH; Frankfurt a. Main, Deutschland

Quantikine human CCL5/Rantes

R&D Systems; Minneapolis, USA

Quantikine human CCL2/MCP-1

R&D Systems; Minneapolis, USA

NRFA-C Kits (zur Messung der FFA)

WAKO Chemicals; Neuss, Deutschland

Histar Detection Kit

ABD Serotec; Düsseldorf, Deutschland

**2.1.10 Pufferzusammensetzungen**

**2.1.10.1 1x RIPA-Gebrauchspuffer**

1 mL RIPA-Puffer 10x

9 mL Aq. dest.

1Tablette Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail-Tablette

1Tablette PhosphoSTOP-Phosphatase-Inhibitor Cocktail-Tablette

#### **2.1.10.2 1x MES-Laufpuffer**

50 mL NuPage MES SDS-Laufpuffer 20x

950 mL *Aq. dest.*

#### **2.1.10.3 Tris-buffered Saline (TBS)**

10 mM Tris

150 mM NaCl

in 1L *Aq. dest.*, pH 7,4

#### **2.1.10.4 TBS plus Tween 20 (TBST)**

1x TBS

0,1% Tween 20

#### **2.1.10.5 5 % BSA-Blockierlösung**

5 g BSA in 100 mL TBST lösen

#### **2.1.10.6 5 % Milch-Blockierlösung**

5 g Magermilchpulver in 100 mL TBST lösen

#### **2.1.10.7 Stripping-Puffer**

200 mM Glycin

0,1% SDS

pH auf 2,0 einstellen

1% Tween 20

#### **2.1.10.8 Transferpuffer für Western-Blot**

50 mL Nupage Transferpuffer 20x

100 mL Methanol

850 mL *Aq. dest.*

#### **2.1.10.9 Natriumcitrat-Puffer**

10 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat auf pH 6,0 einstellen mit 5% HCl

0,05% Tween 20

#### **2.1.10.10 Nile Red-Färbelösung**

25 µL Nile Red Stammlösung

in 2 mL PBS lösen

#### **2.1.10.11 Coomassie-Färbelösung**

40 mL Ethanol

2 mL Essigsäure

0,2 g Coomassie Brilliant blue R-250

ad 100 mL *Aq. dest.*

#### **2.1.10.12 Coomassie-Entfärber**

50% Methanol

1% Essigsäure

ad 100 mL *Aq. dest.*

#### **2.1.10.13 Ponceau S-Färbelösung**

2% Ponceau S in 10% Trichloressigsäure

#### **2.1.10.14 Sirius Red-Färbelösung**

0,1 g Direct Red 80

ad 100 mL 1,2% Pikrinsäure

#### **2.1.10.15 TGF- $\beta$ -Stammlösung**

5  $\mu$ g/mL TGF- $\beta$  in PBS mit 0,1% BSA

#### **2.1.10.16 HBSS/Genta/Hepes**

500 mL HBSS

1 mL Gentamycin

10 mL Hepes

#### **2.1.10.17 HBSS/Genta/Hepes mit EGTA**

120 mL HBSS/Genta/Hepes

1,2 mL 0,05 M EGTA

#### **2.1.10.18 HBSS/Genta/Hepes mit $\text{CaCl}_2$**

120 mL HBSS/Genta/Hepes

1,2 mL 0,5 M  $\text{CaCl}_2$

#### **2.1.10.19 Kollagenase-Perfusionslösung**

240-250 U/mL Kollagenase V in 120 mL HBSS/Genta/Hepes/ $\text{CaCl}_2$  lösen.

Nach dem Lösen der Kollagenase in 10 mL Trägerlösung erfolgte die Sterilfiltration über 0,45  $\mu$ m Pharm Assure-Filter, um danach bis zum Endvolumen aufzufüllen.

### 2.1.11 Software

Computerprogramm	Hersteller
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software;Inc.;La Jolla, CA, USA
iCycler iQ 3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Bio-Rad CFX Manager 2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
LSM Image Browser Zeiss 4.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Deutschland
MS-Office Paket 2010	Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA
Primer 3 Version 0.4.0	Whitehead Institute for Biomedical Research; Cambridge, MA, USA
IBM SPSS-Statistics, Version 19	IBM; Ehningen, Deutschland
Multi Gauge, Version 3.0	FUJIFILM Europe GmbH; Düsseldorf, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellisolation

Für die vorliegende Arbeit wurden unterschiedliche Populationen primärer humaner Leberzellen verwendet. Diese konnten aus Lebergewebe isoliert werden, das aus Leberteilektomien oder Lebertransplantationen (LTx) stammte. Die Operationen erfolgten durch Chirurgen der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, UK Essen, deren Kooperation für diese Arbeit somit essentiell war. Eine substantielle Anzahl an Gewebestücken konnte Dank dieser Zusammenarbeit erhalten und für die Isolation der beschriebenen Leberzelltypen eingesetzt werden. Zur Aufteilung des verwendeten Lebergewebes nach Ätiologie und Operation s. Tabelle 1.

Sofort nach chirurgischer Entnahme des Lebergewebes wurde ein Gewebestück, welches sich möglichst weit entfernt von der chirurgischen Schnittkante und makroskopisch sichtbarem Tumor- oder Metastasen-Gewebe befand, in sterile HBSS-Lösung mit 0,02 mM Gentamicin (Genta) und 0,2 M HEPES (HBSS/Genta/HEPES) überführt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass der Großteil des verwendeten Lebergewebes von der *Capsula fibrosa* umgeben war und nur eine Schnittkante aufwies.



**Tabelle 1: Verteilung des Patientenkollektivs nach Ätiologien für die Präparation primärer humaner HSC**

Ätiologie		Anzahl
virus-unbelastet	hepatozelluläre Metasasen	12
	HCC	6
	CCC	7
	FNH	2
HBV+	Zirrhose	4
	HCC	2
HCV+	Zirrhose	6
	HCC	7

### 2.2.1.1 Isolation humaner primärer Hepatozyten

Die Isolation primärer humaner Hepatozyten wurde unter sterilen Bedingungen mittels Perfusion einer Kollagenase-haltigen Lösung durchgeführt. Für die Perfusion wurden eine Peristaltikpumpe sowie ein Wasserbad und ein Liebigkühler zur konstanten Temperierung der Perfusionslösung auf 41°C eingesetzt. Das Spülen der Leber mit Perfusionslösung fand mittels einer 20 G-Venenverweilkanüle statt, wobei jeweils ein Gefäß gewählt wurde, welches ein möglichst großes Perfusionsareal im Lebergewebe besaß. Die Flussgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Größe des Leberstücks konstant eingestellt (je nach Organgröße von 30 bis 50 mL/min).

Die Fixierung der Kanüle und die Versiegelung (der nicht von der *Capsula fibrosa* umgebenen Oberflächen) mittels Histoacryl-Gewebekleber diente der Vermeidung eines zu schnellen Austretens der Perfusionslösung. Im ersten Perfusionsschritt wurde das im Gewebe befindliche Blut mittels HBSS/Genta/Hepes ausgespült. Erst nachdem die austretende Lösung klar war, erfolgte die Perfusion der Leber mit 120 mL HBSS/Genta/Hepes mit 0,5 mM EGTA. Der anfängliche Efflux von 40 mL der Lösung wurde permanent abgesaugt, und die restlichen 80 mL Lösung wurden verwendet, um das Gewebe für die nächsten 20 min zirkulär zu durchspülen. Anschließend erfolgte nach demselben Prinzip die Perfusion der Leber mit 120 mL Kollagenase-Perfusionslösung (siehe 2.1.10.19). Nach ca. 20-minütiger Perfusionsdauer wurde infolge des Kollagenaseverdaus eine deutlich weiche, aufgeschwemmte Konsistenz des Gewebes und ein Austritt von kleinen Gewebestücken beobachtet. Sodann wurde die Perfusion beendet, das Gewebe auf ein Sieb mit 4 µm Maschenweite (60 mesh) überführt, mit einem Skalpell zerkleinert und unter Zugabe von HBSS/Genta/Hepes mit sanftem Druck mittels eines Stempels durch das Sieb gedrückt. Um Hepatozyten von nicht-parenchymalen Zellen zu separieren, wurde die

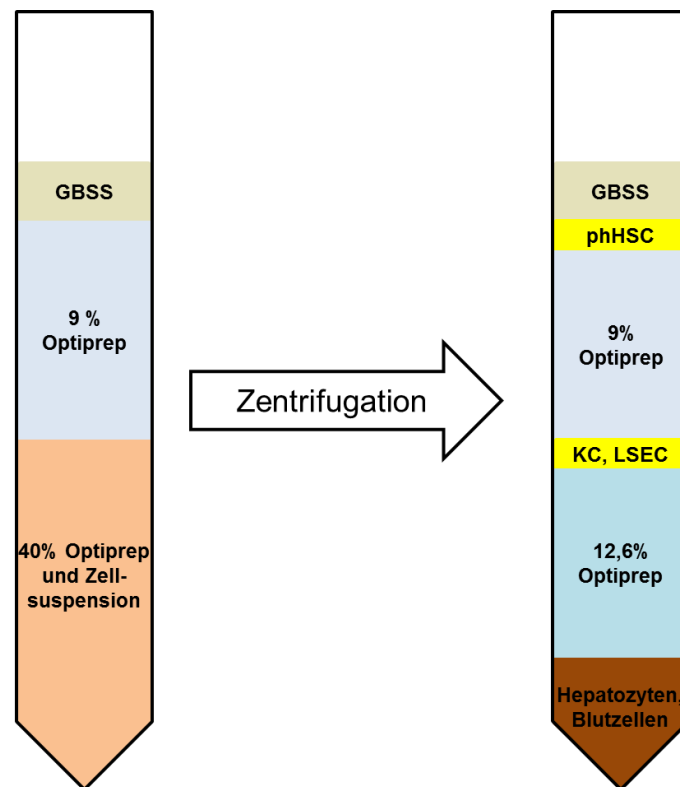
Suspension dreimal zentrifugiert (je 18 g über 10 min bei Raumtemperatur). Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Zellüberstand in ein steriles Gefäß, in welchem 50 mL DMEM mit 10 % FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) vorgelegt worden waren, überführt. Dieser Überstand wurde im späteren Verlauf zur Isolation nicht-parenchymaler Zellen verwendet, wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Es folgte das Auflösen des aus Hepatozyten bestehenden Pellets mit HBSS/Genta/Hepes, wobei sich an die letzte Zentrifugation eine Resuspension der Hepatozyten in Hepatozyten-Zellkulturmedium anschloss (siehe 2.1.5.2). Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblau-Färbung (Neubauer-Zählkammer) wurden die Hepatozyten in einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung einer kollagenisierten 6-Loch-Platte ausgesät. Die ausgesäten Hepatozyten wurden alle 10 min gleichmäßig geschwenkt, um das Absetzen toter Zellen zu verhindern und die gleichmäßige Adhärenz der Zellen zu fördern. Nach 1 h erfolgte ein Mediumwechsel, um sowohl nicht-adhärente als auch tote Zellen zu entfernen. Zur Anpassung der isolierten Hepatozyten an die Kulturbedingungen wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vor Beginn der Experimente für mindestens 12 h kultiviert.

#### **2.2.1.2 Isolation primärer nicht-parenchymaler Leberzellen**

Der unter 2.2.1.1 gesammelte Überstand wurde entweder bei 4°C über Nacht gelagert oder sofort für die Isolation nicht-parenchymaler Zellen verwendet. Der erste Zentrifugationsschritt von 800 g für 10 min bei 4°C diente der Pellettierung der im Überstand befindlichen Zellen. Nachdem der Überstand verworfen und die Pellets in GBSS resuspendiert worden waren, fand die Trennung der nicht-parenchymalen Zellen von restlichen Hepatozyten und Zelldebris mittels dreimaliger Zentrifugation bei 4°C und 50 g für 2 min statt. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand mit den nicht-parenchymalen Zellen in ein frisches 50 mL-Röhrchen überführt und das Pellet in GBSS resuspendiert. Vor der Dichtegradientenzentrifugation erfolgte eine nochmalige Zentrifugation der Überstände (800 g, 4°C, 10 min). Die erhaltenen Pellets wurden in einem geringen GBSS-Volumen resuspendiert und gepoolt (Abbildung 6).

Mit Hilfe der Dichtezentrifugation sollten pHSCs, KCs und LSECs von Hepatozyten und restlichen Blutzellen abgetrennt werden. Hierfür wurden pro 15 mL-Gefäß 1,575 mL 40%ige Optiprep-Lösung mit 3,425 mL Zellsuspension vermischt. Anschließend wurde das so erzeugte 12,6% Zell/Optiprep-Gemisch mit 9%iger Optiprep-Lösung und 2 mL GBSS überschichtet. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten verschiedener

Zellpopulationen wurde durch Zentrifugation (4°C, 1400 g, Beschleunigung: 7; Bremse: 0, Dauer: 21 min) die Auftrennung der diversen nicht-parenchymalen Zellen erzielt.



**Abbildung 6: Dichtezentrifugation zur Zellisolation.**

Schematische Darstellung einer Dichtegradienten-Zentrifugation zur Auftrennung verschiedener nicht-parenchymaler Zelltypen. Links: Zellvorbereitung mit verschiedenen dichten Opti-Prep-Lösungen vor Zentrifugation. Rechts: Resultat nach Zentrifugation bei 1400 g, 4°C für 21 min. Abhängig von ihren spezifischen Dichten verteilen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen in den Grenzschichten zwischen den Opti-Prep-Konzentrationen verschiedener Dichten.

Anschließend wurden die Zellen aus der Grenzschicht zwischen GBSS und 9% Opti-Prep-Lösung (hauptsächlich pHSCs) und die Zellen aus der Schicht zwischen 9% und 12,6% Opti-Prep-Lösung (hauptsächlich KCs und LSECs) in separate 50 mL-Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 800 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (50 g; 4°C; 2 min) sollten die residualen Hepatozyten entfernt werden. Die überführten Überstände wurden zur Bildung eines Zellpellets anschließend nochmals bei 800 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die jeweiligen Pellets wurden für die weitere Isolation in MACS-Puffer resuspendiert.

#### 2.2.1.2.1 MACS-Isolation primärer humaner hepatischer Sternzellen

Das Prinzip der magnetischen Zellsortierung (engl. MACS = *magnetic activated cell separation*) beruht auf der magnetischen Markierung mittels Antikörper-markierter,

zellspezifischer „*Micro Beads*“. Nach Bindung diese immunomagnetischen Aggregate an zellspezifische Oberflächenmoleküle (z.B. CD133 bei pHSCs) erfolgte die Aufreinigung der Zellen in einem Spezialmagneten.

Für die pHSC-Isolation wurden je  $10^8$  in 300  $\mu\text{L}$  MACS-Puffer vorgelegte Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  Fc-Rezeptor (FcR)-Blockierungslösung versetzt, wodurch eine unspezifische oder FcR-vermittelte Bindung des Antikörpers verhindert wurde. Anschließend wurden die pHSCs mit 100  $\mu\text{L}$  anti-CD133 „*Micro Beads*“ versetzt und durch 30-minütige Inkubation markiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit der 20-fachen Puffermenge gewaschen und pelletiert (300 g; 4°C; 10 min). Während der Zentrifugationszeit wurde die LS-Säule in das Magnetfeld eingespannt und die Säule dreimal mit jeweils 3 mL MACS-Puffer gespült. Das in 500  $\mu\text{L}$  MACS-Puffer aufgenommene Pellet wurde über ein Zellseparationsfilter auf die LS-Säule überführt. CD133-negative Zellen wurden durch viermaliges Waschen mit je 3 mL MACS-Puffer eluiert. Nachdem der Puffer die LS-Säule vollständig durchlaufen hatte, erfolgte die Eluierung der CD133-positiven pHSCs mittels 5 mL HSC-Wachstumsmedium (2.1.5.1) aus der Säule, die sich bei diesem Schritt nicht mehr im Magnetfeld befand. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschale überführt, in der 15 mL HSC-Wachstumsmedium vorgegeben war. Die Zellen wurden für ca. 12 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nicht-adhärenz Zellen wurden durch einen Mediumwechsel entfernt. Durch Adhärenz an die Kunststoff-Oberfläche der Zellkulturschale erfolgte über den Kultivierungszeitraum die Aktivierung der ruhenden pHSCs und ihr Übergang in den proliferativen Status. Alle 3 Tage war ein Mediumwechsel erforderlich. Nach 14-tägiger Kultivierung konnten die pHSCs für die im Folgenden beschriebenen Experimente verwendet werden.

#### **2.2.1.2.2 Isolation primärer humaner Kupffer-Zellen und Endothelzellen**

Die ebenfalls mittels MACS-Isolation aufgereinigten KCs und LSECs wurden freundlicherweise durch Frau Melanie Lutterbeck (Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der KCs fand in Kupffer-Zellkulturmedium (2.1.5.3) statt. LSECs wurden in spezifischem Endothelzellmedium (2.1.5.4) auf kollagenisierten Kulturschalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Vor jeder Aussaat der Zellen für eine Versuchsreihe fand die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau-Ausschlussmethode statt. Dieser saure Farbstoff

permeiert die defekten Zellmembranen toter Zellen, bindet als Anion an zytosolische Proteine, und tote Zellen erscheinen somit im Phasenkontrastmikroskop blau. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran bleiben im Phasenkontrast ungefärbt. Zur Zählung wurden 10 µL resuspendierte pHSCs mit 90 µL Trypanblau-Lösung versetzt, in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und gezählt. Die Zellzahl wurde berechnet nach:

$$\text{Zellzahl/mL} = n \times V_f \times 10^4$$

(n = vitale Zellen/Großquadrat;  $V_f$  = Verdünnungsfaktor;  $10^4$  = Faktor aus Kammervolumen).

### **2.2.3 Auftauen und Kultivierung kommerziell erworbener primärer humaner hepatischer Sternzellen (khHSC)**

Aus humanem Lebergewebe isolierte khHSCs der Firma ScienCell (Berlin, Deutschland) wurden tiefgekühlt (mit DMSO) in einer Konzentration von  $>5 \times 10^5$  Zellen bereitgestellt. Die Firma zertifizierte die Reinheit der khHSCs.

Die Kultivierung der khHSCs erfolgte in Poly-L-Lysin ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )-beschichteten Kulturflaschen. Um die khHSCs in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in eine Kulturflasche überführt. Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurden nach 16 h und ca. 40 h nach Aussaat Medienwechsel durchgeführt. Daraufhin fand der Wechsel des Mediums nach folgendem Schema statt: Konfluenz <70 %: alle 3 Tage; Konfluenz >70% täglich.

Das Passagieren von khHSCs setzt eine 90%-ige Konfluenz voraus. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS ohne  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  gewaschen und anschließend mit 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Zum Ablösen der Zellen fanden zwei aufeinanderfolgende Inkubationen mit Trypsin/EDTA bei 37°C statt. Die nach leichtem Abklopfen und Spülen mit 8 mL PBS gelösten khHSCs wurden in ein 50 mL-Röhrchen überführt. Nachdem die Zellen bei 300 g und Raumtemperatur für 5 min pelletiert und im frischen Wachstumsmedium resuspendiert worden waren, wurden die Zellen erneut ausplattiert ( $1,5 \times 10^6$  Zellen in 10mL pro  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflasche).

### **2.2.4 Kultivierung der isolierten primären hepatischen Sternzellen**

Isolierte pHSCs wurden unter sterilen Bedingungen in HSC-Wachstumsmedium (siehe 2.1.5) bis zur 90%-igen Konfluenz kultiviert (37°C; 5%  $\text{CO}_2$ ; wasserdampfgesättigte Atmosphäre). Ein Mediumwechsel zwecks Wachstum und Erhalt der Zellvitalität erfolgte bis zu einer Konfluenz von 70% alle drei Tage und anschließend

täglich. Für die Versuchsreihen wurden pHSCs ausschließlich bis zur vierten Passage verwendet und anschließend verworfen.

Bei 90%-iger Konfluenz der adhärent wachsenden pHSCs war das Passagieren der Zellen oder die Aussaat für verschiedene Versuchsreihen notwendig. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und mit 3 mL Trypsin/EDTA überschichtet. Nach Inkubation von 2-3 min im Brutschrank bzw. bis zum Lösen der Zellen durch leichtes Abklopfen wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 10 mL Wachstumsmedium abgestoppt. Durch mehrmaliges Aspirieren und Injizieren konnten die von der Flaschenoberfläche abgelösten und resuspendierten Zellen in ein 50 mL-Röhrchen überführt werden. Nach 10-minütiger Zentrifugation (300 g; RT) wurde das Zellpellet in frischem HSC-Wachstumsmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:10 neu ausplattiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl war essentiell für die Durchführung der Experimente.

### **2.2.5 Einfrieren und Auftauen der isolierten pHSC**

Die Entnahme von isolierten pHSC zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgte ausschließlich in der ersten Passage. Trypsiniert wurde gemäß 2.2.4. Die Resuspension des Zellpellets in 1 mL HSC-Wachstumsmedium mit 10% DMSO fand nach zweimaliger 5-minütiger Zentrifugation bei 300 g und  $4^{\circ}\text{C}$  statt. Anschließend wurden die pHSC zu  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingefroren.

Zur Aufnahme gelagerter pHSCs in Kultur wurden diese im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in eine mit 15 mL HSC-Wachstumsmedium versehene Kulturflasche überführt. Medienwechsel wurden 16 h sowie ca. 40 h nach Aussaat durchgeführt, um verbleibendes DMSO vollständig zu entfernen. Die nachfolgende Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

### **2.2.6 Behandlungsstrategien mit unterschiedlichen Substanzen**

Um Effekte einer *in vitro*-Verfettung, einer TGF- $\beta$ - bzw. VD-Behandlung und die Beteiligung des VDR an diesen Effekten zu untersuchen, wurden pHSCs mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Zur Ermittlung der VDR-Beteiligung erfolgte mittels transienter siRNA-Transfektion eine Reduktion der VDR-Expression (siRNA-*Knock-down*).

Zwecks anschließender a) mRNA-Isolierung wurden Zellen in einer Dichte von ca.  $2 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 6-Lochplatte und b) Proteinisolation in einer Dichte von ca.  $4 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h Kultivierung in

HSC-Wachstumsmedium erfolgte nach zweimaligem Waschen mit serumfreiem DMEM eine weitere Inkubation der pHSCs für 24 h in serumfreiem DMEM. Eine Änderung des verwendeten Mediums war notwendig, um a) die Wirkungen der eingesetzten Substanzen im HSC-Wachstumsmedium und b) die im FBS enthaltenden VD-Konzentrationen auszuschließen. Somit konnte eine Veränderung der Endkonzentration an VD in unbekannter Höhe ausgeschlossen und demzufolge die VD-Wirkung auf pHSCs untersucht werden. Anschließend erfolgten die jeweiligen Behandlungen der pHSCs mit den unterschiedlichen Substanzen.

#### **2.2.6.1 *In vitro*-Behandlung primärer hepatischen Sternzellen mit freien Fettsäuren und Vitamin D<sub>2</sub>**

Die FFA Oleat und Palmitoleat wurden jeweils als 100 mM Emulsion in PBS mit 1% BSA-Fraktion V (fettfrei) angesetzt und im Verhältnis von 2:1 (2 Teile Oleat und 1 Teil Palmitoleat) gemischt. Aliquots wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Stimulation der pHSC erfolgte 48 h nach Aussaat der Zellen für eine Stunde mit einer FFA-Lösung (Endkonzentration 0,25 mM) bzw. Lösungsmittel in serumfreiem DMEM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Höhere FFA-Konzentrationen und längere Inkubationszeiten kamen nicht zum Einsatz, da die nichtregulierte FFA-Aufnahme die pHSC zerstörte. Nach einstündiger FFA-Inkubation wurde das Medium gewechselt und für 24-48 h durch VD<sub>2</sub> (Endkonzentration 1 µM) bzw. Ethanol (0,1%) (Kontrolle) in serumfreiem DMEM ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 h wurden die Zellen geerntet und die RNA bzw. das Gesamtprotein isoliert (vgl. 2.2.8.1 und 2.2.9.1).

#### **2.2.6.2 *In vitro*-Behandlung primärer hepatischen Sternzellen mit TGF-β und VD<sub>2</sub>**

Für die *in vitro*-Behandlungen der pHSC mit TGF-β und VD<sub>2</sub> wurde eine Zellzahl wie unter 2.2.4 beschrieben eingesetzt. In dieser Versuchsreihe wurde eine zusätzliche Analyse der Proteinexpression in den verschiedenen Zellkompartimenten durchgeführt. Aufgrund der geringen Proteingewinnung mussten 2 x 10<sup>6</sup> pHSCs pro 16 cm-Kulturschale ausgesät werden. Ihre Kultivierung bis zum Behandlungsbeginn erfolgte gemäß 2.2.4.

Der verwendete rekombinante TGF-β wurde zu einer 5 µg/mL Stammlösung in PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) mit 0,1% BSA gelöst, anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Behandlung der pHSCs erfolgte 48 h nach Zellaussaat. Auch bei dieser *in vitro*-Stimulation wurde serumfreies DMEM als Versuchsmedium verwendet. Vor Zugabe des VD<sub>2</sub> (Endkonzentration 1 µM) bzw. des Ethanol (0,1%) erfolgte eine einstündige Vorstimulation der Zellen mit TGF-β (Endkonzentration 0,5 ng/mL, 2 ng/mL) bzw. dem Lösungsmittel. Im Gegensatz zur *in vitro*-Stimulation der Zellen mit FFAs und VD<sub>2</sub> war in dieser Versuchsreihe kein Mediumwechsel zwischen TGF-β und VD<sub>2</sub>-Gabe notwendig. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation fand die Ernte der Zellen und die nachfolgende RNA- bzw. Proteinisolierung statt.

#### **2.2.6.3 *In vitro*-Behandlung der pHSC mit TGF-β und TGF-β-Rezeptor-Kinase-Inhibitor für 24 h**

Die Analyse der Effekte des TGF-β-Signalweges auf das profibrotische und proinflammatorische Expressionsverhalten wurde auf der Proteinexpressionsebene untersucht. Die Behandlung der Zellen erfolgte 48 h nach Aussaat. Hierzu wurden die pHSCs mit TGF-β (Endkonzentration 2 ng/mL) bzw. mit TGF-β plus TGF-β-Rezeptor-Kinase-Inhibitor (Endkonzentrationen 10 nM–10 µM) in serumfreiem DMEM für 24 h inkubiert und anschließend für die Isolation des Proteins geerntet.

#### **2.2.6.4 Transiente Transfektion von pHSC mit VDR-siRNA und Behandlung der Zellen mit TGF-β und VD<sub>2</sub> für 24 h**

Die molekularbiologische transiente Transfektion von Zellen mit spezifischer siRNA nutzt den natürlichen Mechanismus der RNA-Interferenz in eukaryotischen Zellen, um eine zielgerichtete, posttranskriptionale Genrepression zu erzielen. Die synthetisch hergestellten, 21–22 bp langen, doppelsträngigen siRNAs weisen einen 3'-Überhang von zwei Nukleotiden und ein phosphoryliertes 5'-Ende auf. Nach dem Eindringen der spezifischen siRNA in die Zelle ist diese an der Ausbildung eines Komplexes, dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) beteiligt. Dieser mit Nukleasen und anderen regulatorischen Proteinen ausgestattete Komplex erzielt nach Bindung an die Ziel-mRNA und Komplexaktivierung ein sequenzspezifischen, endonukleolytischen Abbau der mRNA. Die so fragmentierte mRNA steht der Translation nicht mehr zur Verfügung.

Für die Transfektion der pHSCs mit spezifischer VDR-siRNA bzw. nicht-kodierender (engl.: *non silencing* = ns) Kontroll-siRNA wurden Zellen im HSC-Wachstumsmedium ohne Pen/Strep ausgesät und für 24 h kultiviert (zu den Zellzahlen vgl. Tabelle 2).



**Tabelle 2: Zelldichte bei RNA- und Protein-Experimenten**

Versuch	Zellzahl/Vertiefung
Genexpression	$0,04 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte
Proteinexpression	$0,3 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte

Die Zelltransfektion mit siRNA erfolgt mit dem Transfektionsreagenz (TR) Lipofectamin RNAiMAX, das der extrazellulären siRNA-Stabilisierung dient und die siRNA-Aufnahme über die Zellmembran ermöglicht.

Um eine bestmögliche Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die optimalen siRNA- und Lipofectamin-Konzentrationen ermittelt. Aufgrund der begrenzten Menge verfügbarer isolierter pHSCs erfolgten diese Tests an khHSCs. Hierfür wurden verschiedene siRNA-Konzentrationen (100 pM–25 nM) und unterschiedliche Volumina an Lipofectamin (0,5 µL–1 µL) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche (vgl. 3.4.2) bildeten die Grundlage der nachfolgenden Experimente.

Für die Versuche an isolierten pHSCs wurde jeweils die unter 3.4.2 ermittelte Menge an siRNA (Endkonzentration: 25 nM) und 0,75 µL Lipofectamin verwendet. Diese wurden in 50 µL Opti-MEM I Reduced Serum Medium verdünnt, die Ansätze zu gleichen Teilen vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Parallel hierzu wurde das HSC-Wachstumsmedium entfernt und 500 µL (12-Lochplatte) bzw. 1 mL (6-Lochplatte) Opti-MEM I Reduced Serum Medium hinzugegeben. Die Zugabe des siRNA-Lipofectamin/Medium-Gemisches zu den Zellen fand unter vorsichtigem Schwenken statt (12-Lochplatte: 100 µL, 6-Lochplatte: 200 µL). Als Wildtyp (WT)-Kontrollen wurden pHSCs nur mit Opti-MEM I Reduced Serum Medium (12 Lochplatte: 600 µL, 6-Lochplatte: 1200 µL) versetzt. Nach 8-stündiger Inkubation und zweimaligem Waschen der pHSCs mit HSC-Wachstumsmedium ohne Pen/Strep schloss sich die Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank für ca. 12 h an. Vor Behandlung der Zellen mit TGF-β und VD<sub>2</sub> wurde das HSC-Wachstumsmedium durch DMEM ohne Zusätze ersetzt und für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Es folgte die Behandlung der pHSC wie unter 2.2.6.2 mit TGF-β (Endkonzentration 0,5 ng/mL, 2 ng/mL) und VD<sub>2</sub> (Endkonzentration 1 µM) für 24 h. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. Gesamtprotein isoliert (siehe 2.2.8.1 und 2.2.9.1).

#### **2.2.6.5 Behandlung der pHSC mit TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> für 15-60 min**

Die Untersuchungen der Kurzzeiteffekte von VD<sub>2</sub> in aktivierten pHSCs erfolgten sowohl an siRNA-transfizierten und nicht-transfizierten pHSCs. Die Transfektion mit siRNA und Kultivierung der Zellen bis zur Behandlung erfolgte gemäß 2.2.6.4. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$  (Endkonzentration: 0,5 ng/mL) und VD<sub>2</sub> (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) in serumfreiem DMEM erfolgte für ein Zeitraum von 15–60 min. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Gesamtprotein isoliert.

#### **2.2.6.6 Behandlung der pHSC mit TGF- $\beta$ und 30-minütiger VD<sub>2</sub>-Vorinkubation für 15-60 min**

Für diese Untersuchung der Kurzzeiteffekte wurden ausschließlich nicht-transfizierte Zellen verwendet. Zur Abklärung eines möglichen VD-Effekts nach vorheriger Stimulation der Zellen mit VD erfolgte ihre Vorinkubation mit VD<sub>2</sub> (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) bzw. Ethanol (0,1%) für 30 min mit anschließender TGF- $\beta$ -Gabe (Endkonzentration: 0,5 ng/mL) bzw. Lösungsmittel für 15–60 min. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und das Gesamtprotein isoliert.

#### **2.2.7 Vitamin D-Rezeptor-Degradation**

Zur Überprüfung der Wirkung von VD<sub>2</sub> auf die VDR-Degradation wurden je 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 16 cm<sup>2</sup> Kulturschale, versetzt mit HSC-Wachstumsmedium, ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für ca. 24 h kultiviert. Zweimaliges Waschen mit serumfreiem DMEM diente der vollständigen Entfernung der Wachstumsfaktoren und des FBS. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation der Zellen in serumfreiem DMEM erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit VD<sub>2</sub> bzw. Ethanol (0,1%) in serumfreiem DMEM und die Isolation des Gesamtproteins (vgl. 2.2.9.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. 2.2.9.4), wurden die auf 30  $\mu$ g eingestellten Lysate für 10 min bei 22°C unter kontinuierlichem Schütteln mit Trypsin (Konzentrationen: 1–4  $\mu$ g/mL) inkubiert. Die durch Trypsin induzierte Degradation wurde anschließend durch Zugabe von 1/5 des 5-fach konzentrierten „*Lane Marker Sample Buffer*“ und fünfminütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Die weitere Detektion der VDR-Degradation erfolgte mittels Western-Blot (vgl. 2.2.9.5).

#### **2.2.8 Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren**

##### **2.2.8.1 RNA-Isolation aus Zellkulturen**

Die Isolation der Gesamt-RNA aus behandelten pHSCs wurde mittels „*RNeasy-Mini Kit*“ mit den enthaltenen Puffern durchgeführt. Nach den entsprechenden

Inkubationszeiten der behandelten pHSCs wurde das Medium gründlich abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit RLT-Puffer (Lysepuffer) versetzt. Für die Vertiefungen einer 12- bzw. einer 6-Lochplatte wurden 300 µL bzw. 600 µL RLT-Puffer zur Zellüberschichtung eingesetzt. Durch den RLT-Puffer wurden a) die Zellen lysiert und b) die RNAsen durch das im Puffer enthaltene Guanidinisothiozyanat inhibiert. Nach sorgfältigem Ablösen der Zellen mittels Zellschaber und Überführung der Zellsuspension in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß, folgte die Injektion und Aspiration der Zellsuspension in einer 1 mL-Spritze mit 27 G-Kanülenaufsatz. Durch die hierbei auftretenden Scherkräfte wurden sowohl die Zellen als auch die DNA mechanisch zerstört. An diesem Punkt war neben der direkten Weiterverarbeitung auch eine Lagerung der Proben bei -20°C möglich. Im Anschluss konnten die Proben entweder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet werden. Je nach Zellmenge wurde 70%-iges Ethanol (12-Lochplatte: 300 µL, 6-Lochplatte: 600 µL) zu den Zellen gegeben und die Suspensionen vorsichtig gemischt und auf eine Silikatsäule überführt. Die weitere RNA-Isolation fand nach Herstellerangaben statt: Nach Bindung der RNA an eine Silikat-Membran und mehrmaliges Waschen wurde die aufgereinigte RNA mittels 30 µL RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert.

#### **2.2.8.2 RNA-Isolation aus Lebergewebe**

Für die RNA-Isolation aus Lebergewebe wurden etwa stecknadelkopfgroße Gewebestücke verwendet. Hierfür musste das Gewebe in 2 mL Trizol mittels Ultra-Turrax homogenisiert, anschließend mit 200 µL Chloroform versetzt, gründlich gemischt und für 2–3 min bei RT inkubiert werden. Durch Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g für 15 min wurde eine Phasentrennung erzielt. Die hierbei entstandene obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, in dem die RNA-Fällung durch eine Inkubation über 10 min mit 500 µL Isopropanol erreicht werden konnte. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g für 15 min wurde das Pellet mit 1 mL 75%-igen Ethanol gewaschen und bei 4°C und 7.500 g für 5 min zentrifugiert. Die Entfernung der verbliebenen Flüssigkeit erfolgte mittels Kapillare. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 100 µL RNase-freiem Wasser schloss sich die Zugabe von 250 µL Ethanol und 350 µL RLT-Puffer sowie die Überführung der Lösung auf eine Silikatsäule an. Die weitere Aufreinigung gemäß 2.2.8.1.

### 2.2.8.3 RNA-Quantifizierung

Zwecks Umschreibung der isolierten RNA mittels reverser Transkription in eine *complementary DNA* (cDNA) erfolgte zunächst die Quantifizierung der RNA; diese fand photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $\lambda = 280 \text{ nm}$  in einer UV-Licht-durchlässigen Einmalküvette statt. Über den Quotienten  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  wurde die Reinheit der RNA ermittelt, deren  $\text{OD}_{260/280}$  idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten. Für das weitere Vorgehen wurde die RNA auf  $60 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (Zell-Isolate) bzw.  $125 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (Gewebe-Isolate) eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.8.4 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Zur Durchführung quantitativer RT-PCR wurde die isolierte, gereinigte, einsträngige RNA in einen cDNA-Doppelstrang umgeschrieben. Die hierfür verwendete multifunktionale reverse Transkriptase synthetisiert mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase einen RNA-DNA-Hybridstrang. Durch die vorhandene RNase H-Aktivität wird anschließend die an dem cDNA-Strang befindliche RNA spezifisch abgebaut und letztlich die vorhandene einsträngige cDNA durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase vervollständigt.

Durchgeführt wurde die reverse Transkription mit dem „*QuantiTect® Reverse Transcriptions Kit*“. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mit  $600 \text{ ng}$  (Zell-Isolat) bzw.  $1000 \text{ ng}$  (Gewebe-Isolat) RNA pro Ansatz.

### 2.2.8.5 Quantitative RT-PCR

Die PCR ermöglicht unter Verwendung spezifischer Oligonukleotidsequenzen die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente. Durch mehrfache Repetition der Sequenz aus Denaturierung, Annealing und Elongation kann eine exponentielle Vermehrung geringer DNA-Mengen erzielt werden. In der Denaturierung wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt, wodurch sich in der Annealingzeit die Primer an den flankierenden Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereiches anlagern können. Die verwendete Annealingtemperatur richtet sich nach dem verwendeten Primer und sollte immer  $5^\circ\text{C}$  unterhalb der Primer-Schmelztemperatur liegen. In der Elongation wird der Einzelstrang ausgehend von den Primern mittels DNA-Polymerase in  $5' \rightarrow 3'$  Richtung vervollständigt. Die exponentielle Amplifizierung kann für maximal 40 Zyklen wiederholt werden.

Bei der quantitativen RT-PCR wird anstelle von genomischer DNA eine durch reverse Transkription umgeschriebene cDNA eingesetzt. Zusätzlich ermöglicht sie die kinetische

Messung der Konzentration an PCR-Produkten in Echtzeit durch Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes. In der vorliegenden Arbeit wurde SYBR Green eingesetzt, das ausschließlich in doppelsträngige DNA interkaliert. Somit war die bei  $\lambda = 521 \text{ nm}$  gemessene Fluoreszenzemission von der im Reaktionsgefäß vorhandenen DNA-Menge abhängig. Die Fluoreszenz wurde in jeder Probe nach jedem Zyklus gemessen. Derjenige Zyklus, indem die ermittelte Intensität den Grenzwert (*threshold*) der Hintergrundfluoreszenz überstieg, wurde als Beginn des exponentiellen Anstiegs (der DNA-Konzentration und damit der Fluoreszenz) angesehen (*cycle threshold = ct*). Mit Hilfe dieser Methode konnte eine semiquantitative Aussage zur Genexpression getroffen werden, da jeweils eine definierte mRNA-Menge in cDNA umgeschrieben wurde und in der PCR zusätzlich die Messung des Referenz-Gens der Hypoxanthin/Guanin-Phosphorybosyltransferase (HPRT) erfolgte. Das Referenz-Gen sollte durch die Behandlung (von Zellen, Tieren usw.) nicht oder nur geringfügig verändert werden.

#### **2.2.8.6 Primerdesign**

In dieser Arbeit wurde der Großteil an verwendeten Nukleotidsequenzen über die PubMed Nukleotid-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ermittelt. Zur Generierung der Primer dienten sowohl das Online-Programm „*Primer 3*“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) als auch die Funktion „*pick primers*“ bei PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Bei dem Primerdesign mussten verschiedene Kriterien (z.B. Primerlänge, AT:GC-Verhältnis von 40–50 %, keine Sekundärstrukturen, Exon-Exon-Konjunktion) beachtet werden, da die verwendeten Nukleotidsequenzen ein Kernelement der quantitativen RT-PCR darstellen. Die generierten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Eurofins MWG GmbH; Ebersberg; Deutschland) synthetisiert. Die zur Verifizierung der pHSC mittels qRT-PCR benötigten Primer wurden von der Firma Qiagen bezogen.

##### **2.2.8.6.1 Durchführung der quantitativen RT-PCR**

Für die Messung der mRNA-Expression in der quantitativen RT-PCR wurde das QuantiTect SYBR Green-System nach Herstellerangaben verwendet. Die Durchführung der quantitativen RT-PCR erfolgte in PCR-Thermocyclern (iCycler IQ, C1000 Touch Thermal Cycler). Die Reaktionsansätze wurden in einer 96-Lochplatte jeweils als Doppelbestimmung erstellt (vgl. Tabelle 3). Für unterschiedliche Thermocycler erfolgten entsprechende Anpassungen der Volumina.

**Tabelle 3: Reaktionsansätze für QRT-PCR**

iCycler iQ	Substanzen	C1000 Touch Thermal Cycler
1 µL	Primer forward (10 pmol/µL)	0,5 µL
1 µL	Primer revers (10 pmol/µL)	0,5 µL
15 µL	SYBR Green Mastermix	7,5 µL
11 µL	RNase-freies Wasser	4,5 µL
2 µL	cDNA	2,0 µL

Um eine falsch positive Amplifikation auszuschließen, wurden Negativ-Kontrollen mitgeführt. Diese enthielten anstelle von DNA RNase-freies Wasser. Nachdem die 96-Lochplatte befüllt war, wurde diese mit lichtdurchlässiger Folie versiegelt, gemischt und zentrifugiert. Um die Hintergrundfluoreszenz jeweils zu normalisieren, wurde bei Verwendung des iCycler iQ zusätzlich vor der eigentlichen Messung eine Platte mit *External-Well-Factor-Solution* gemessen. Die 96-Lochplatte mit den Reaktionsansätzen wurde dann auf der Halterung bzw. dem Heizblock im Thermocycler platziert und das PCR-Programm gestartet. Da die Taq-Polymerase durch einen spezifisch gebundenen Antikörper inaktiviert war, begann jedes Programm mit einer 15-minütigen Inkubation bei 95°C, um die Polymerase zu aktivieren. Anschließend erfolgte die Durchführung eines aus insgesamt 40 Zyklen bestehenden Programms. Zum Programm für die verschiedenen Thermozyklen vgl. Tabelle 4.

**Tabelle 4: Cyclerprogramme**

iCycler iQ		C1000 Touch Thermal Cycler
95°C, 30 s	Denaturierung	95°C, 30 s
50-60°C, 30 s	Annealing	50-60°C, 30 s
72°C, 30 s	Elongation	72°C, 30 s

Nach Beendigung jedes Zyklus' wurde die Fluoreszenzemission des SYBR Greens in Echtzeit detektiert und gespeichert.

Um die Größe und die Spezifität der enthaltenen PCR-Produkte zu überprüfen, schloss sich nach Abschluss der qRT-PCR eine Schmelzpunktbestimmung an. Hierzu erfolgte die schrittweise Reduktion der Temperatur um jeweils 0,5°C für je 10 s über einen Temperaturbereich von 95–55°C. Die Schmelzpunkte gleicher Amplifikate (Templates aus gleichem Ursprung; gleiche Primer) sollten jeweils identisch sein, um unspezifische Produkte ausschließen zu können.

#### 2.2.8.6.2 Auswertung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Durch die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode konnte aus den gemessenen  $C_t$ -Werten eine semiquantitative Analyse der mRNA-Expression erstellt werden. Im ersten Schritt der Berechnung wurden die erhaltenen  $C_t$ -Werte für das jeweilige Zielgen auf das konstitutiv exprimierte Referenz-Gen HPRT normalisiert [ $\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$ ].

Nach der Normalisierung für die jeweilige Probe wurde das  $\Delta C_t$  der jeweiligen Probe in Relation zum  $\Delta C_t$  der Kontrolle gesetzt. [ $\Delta\Delta C_t = C_t \text{ Probe} - C_t \text{ Kontrolle}$ ].

Da für die Berechnung von einer 100%igen Primer-Effizienz ausgegangen wurde (die in der Realität nicht erreicht wird), bei der sich pro Zyklus die DNA-Menge verdoppelt, ergibt sich für die logarithmische Funktion die Basis 2 [ $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ]. Somit konnte für jedes Zielgen die relative Expressionsrate (sog. „fold change“) gegenüber der unbehandelten Kontrolle in Bezug auf die jeweilige HPRT-Expression wiedergegeben werden.

### 2.2.9 Proteinisolation und -nachweis

#### 2.2.9.1 Herstellung von Gesamtprotein-Zelllysates

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchszeitraums erfolgten Zellernte und Isolation des Gesamtproteins bei 4°C. Hierfür wurden die adhärent wachsenden pHSCs auf Eis positioniert, das Medium abgesaugt und das verbliebene Medium durch Waschen der Zellen mit PBS, versetzt mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , entfernt. Nach gründlichem Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  RIPA-Puffer-Gebrauchspuffer und 1  $\mu\text{L}$  pMSF pro Vertiefung einer 6-Lochplatte. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Durch die im RIPA-Gebrauchspuffer enthaltenen Salze und Detergenzien wurden die Proteine aus ihrer Struktur herausgelöst und optimale pH- und Ionenverhältnisse für die elektrophoretische Auftrennung geschaffen. Nach Inkubation der Proteinlösung für 15 min bei 4°C schloss sich eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 g an. Die sedimentierten, unlöslichen Zellbestandteile wurden verworfen und die Protein-Lösung in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.9.2 Fraktionierte Proteinisolation aus Zytosol und Nukleus

Neben der Gewinnung von Gesamtproteinlysaten wurden mittels des *Nuclear Extraction Kits* Proteinlysate verschiedener Zellkompartimente isoliert. Die Isolation der Proteinlysate erfolgte nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieser Auftrennung in Proteinextrakte des Zytosols und des Nukleus' beruht auf unterschiedlichen Salzkonzentrationen und Detergenz-Zusammensetzungen in den jeweiligen Extraktionspuffern.

Die mittels des *Nuclear Extraction Kits* isolierten Zytosol- und Nukleus-Proteinextrakte wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.9.3 Isolation von Proteinlysaten aus Lebergewebe**

Das Gesamtprotein wurde aus den in *RNA-Later* bei -80°C gelagerten Leberbiopsien isoliert. Sowohl das Auftauen der Gewebestücke als auch die weiteren Isolations-schritte erfolgten bei 4°C. Etwa stecknadelkopfgroße Gewebestücke mussten zur Entfernung des *RNA-Later* in eiskalter PBS (mit 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) gewaschen werden. Anschließend wurden die Gewebestücke in 400 µL RIPA-Gebrauchspuffer mit 4 µL pMSF überführt und mittels Tissue Ruptor von Qiagen homogenisiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 4°C, 14.000 g für 20 min wurden die entstandenen Gesamtproteinlysate in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **2.2.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen der nach 2.2.9.1, 2.2.9.2 und 2.2.9.3 erhaltenen Lysate wurde nach Bradford mittels des *Pierce BCA Protein Assay Kits* bestimmt. Die Durchführung des Testes erfolgte nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieses zweistufigen Testes basiert auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup>. Im anschließenden Reaktionsschritt chelatisieren die proportional zur Proteinkonzentration entstandenen Cu<sup>1+</sup>-Ionen mit der Bicinchoninsäure, wodurch ein blauer Farbumschlag erfolgt, dessen Intensität kolorimetrisch gemessen werden kann.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand in 96-Lochplatten statt. Hierzu wurden je 10 µL verdünnte Probe bzw. BSA-Standard mit 200 µL BCA-Gebrauchslösung (1 mL Reagenz B + 50 mL Reagenz A) vermischt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei  $\lambda = 560$  nm im ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Anhand der mitgeführten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

#### **2.2.9.5 Western-Blot (Immunoblotting)**

In Proteingemischen konnten bestimmte Proteine spezifisch mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Proteinlysate mittels SDS-Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Trägermembran „geblottet“. Anschließend erfolgte die Detektion des gesuchten Proteins durch die Bindung spezifischer, markierter Antikörper. Durch die Verwendung eines Proteingrößenstandards wurden gleichzeitig Informationen über die Proteingröße und über die relative Expression im Vergleich zwischen unterschiedlichen Bedingungen erhalten.



#### **2.2.9.5.1 Elektrophoretische Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamid Gel**

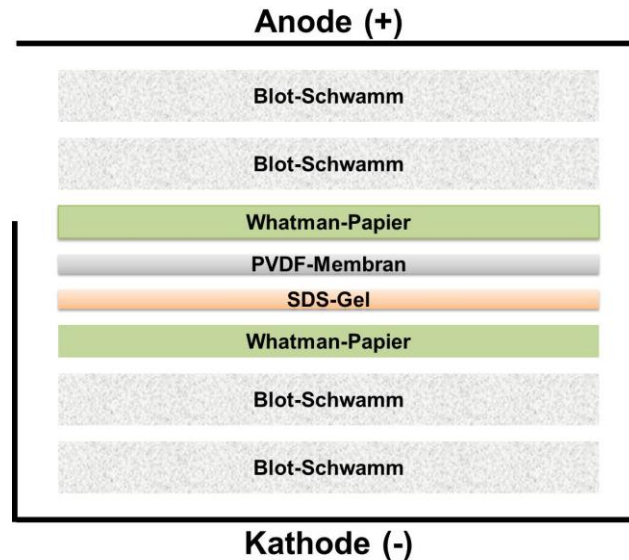
Durch eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese können - unter denaturierenden Bedingungen - Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Die ausschließliche Auftrennung nach Molekulargewicht wurde durch die Zugabe von SDS zu den Proben erreicht, da dieses anionische Detergenz mit seiner negativen Ladung durch Anlagerung an das Protein dessen Eigenladung kompensiert. Durch die gegenseitig abstoßenden Ladungen des SDS entfalten sich die Proteine und verlieren somit ihre Tertiär- und Sekundärstrukturen. Diese wurden zudem durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen bei 95°C aufgehoben. In den Proteinen enthaltene Disulfidbrücken wurden durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) gespalten, was eine Linearisierung der Proteine erleichterte.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde für die SDS-Gelelektrophorese jeweils auf eine Gesamtproteinmenge von 30 µg eingestellt. Zusätzlich wurde zu jeder Probe 1/5 des Volumens an *Lane Marker Sample Buffer* (Thermo Scientific) hinzugefügt und anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. In der Inkubationszeit wurden die für die SDS-Gelelektrophorese verwendeten „*Nupage 4-12 % Bis-Tris SDS Page*“ Gele in das *XCell SureLock™ Mini-Cell* System eingespannt, mit 1 x MES-Puffer überschichtet, die Kämme entfernt und die Taschen mit dem Puffer gespült. Nach Abkühlen und Abzentrifugieren der Proben erfolgte das Auftragen sowohl der 5 µL *Page Ruler Prestained Protein Marker* (Fermentas) als auch der Proben auf das Gel. Die Elektrophorese erfolgte bei  $U = 150 \text{ V}$  für ca. 80 min und wurde beendet, sobald der Probenpuffer die untere Gelkante erreicht hatte.

#### **2.2.9.5.2 Nasstransfer der Proteine auf PVDF-Membranen („Blotting“) und Nachweis**

Für die Übertragung der mittels SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde der Nasstransfer mit dem *XCell IITM Blot Module* verwendet. PVDF-Membranen mussten zunächst durch eine 10-minütige Inkubation in Methanol aktiviert werden. Die für den Transfer benötigten Schwämme, die Whatman-Papiere und die aktivierte PVDF-Membran wurden in Transferpuffer getränkt, bevor die Überführung der Proteine auf die aktivierte PVDF-Membran in Transferpuffer stattfinden konnte. Nach Beendigung der Proteinauftrennung wurden die einzelnen Bestandteile für den Transfer nach Herstellerangaben luftblasenfrei in die Blot-Kassette überführt (siehe Abbildung 7). Die im Gel aufgetrennten Proteine konnten durch ein elektrisches Feld in einem vollständig beflutenden Puffertank auf eine PVDF-Membran übertragen werden, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben. Der Transfer erfolgte bei  $I = 200 \text{ mA}$  pro Gel über einen Zeitraum von 60 min. Zur

Überprüfung der Blot-Effizienz wurden die Proteine auf den PVDF-Membranen durch 5-minütige Inkubation mit Ponceau S-Färbelösung reversibel angefärbt und anschließend mittels Wasser wieder entfärbt. Dadurch konnten die übertragenden Proteine als Bande sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 7: Bestückung der Blot-Kassette.**

Schematische Darstellung des Aufbaus einer Blot-Kassette zum Transfer der aufgetrennten Proteine aus einem SDS-Gel auf die PVDF-Membran im elektrischen Feld beim Nasstransfer (adaptiert nach "Using the Xcell IITM Blot Module", Invitrogen).

#### 2.2.9.5.3 Immunologischer Proteinnachweis

Nach der Überprüfung der Blot-Effizienz wurden die PVDF-Membranen für 1 h auf einem Schüttler bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert. Dadurch wurde eine Absättigung unspezifischer Bindungen erreicht, wodurch eine Detektion spezifischer Banden mittels Antikörper vorgenommen und eine etwaige Hintergrundfärbung vermieden wurde. Nachdem die Membranen dreimal für je 5 min in TBST gewaschen worden waren, erfolgte ihre Inkubation in 2 mL Puffer mit entsprechender Konzentration des Primärantikörpers (Tabelle 5) für  $\geq 12$  h bei 4°C unter kontinuierlichem Schwenken. Anschließend wurde überschüssiger, nichtgebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen von je 5 min in TBST entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung eines mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpers (Tabelle 6) an den Primärantikörper durch einstündige Inkubation der Membranen bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Bevor die chemolumineszente Detektion des Antikörper/Farbstoff-Konjugats stattfinden konnte, wurden die Membranen erneut dreimal für je 5 min in TBST gewaschen. In dieser Arbeit fand die Detektion mittels *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* nach Herstellerangaben statt. Die

Exposition erfolgte auf einem digitalen Röntgenfilm des LAS-3000 (Fuji Film Europe, Düsseldorf, Deutschland), welcher die als Lichtenergie abgestrahlte Reaktionsenergie des Oxidationsprozesses detektierte. Auf den digitalen Bildern konnten die sichtbaren Banden anhand des verwendeten Proteingrößenstandards mittels Multi Gauge Version 3.0 (Firma Fuji Film) zugeordnet und ausgewertet werden. Des Weiteren wurden die behandelten Proben ins Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle gesetzt.

**Tabelle 5: Primärantikörper und ihre Anwendung**

Antikörper-Spezifität	Blockierungspuffer	Verdünnung	Antikörperpuffer
Anti-Col1 $\alpha$ 1	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti-Erk	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti-GAPDH	5% Milch-TBST	1:2000	5% BSA-TBST
Anti-HSP90	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti-pErk	5% Milch-TBST	1:1000	5% BSA-TBST
Anti-pSmad2	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti- pSmad3	5% Milch-TBST	1:500	5% BSA-TBST
Anti-Smad2	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti-Smad3	5% Milch-TBST	1:1000	5% BSA-TBST
Anti-Smad4	5% Milch-TBST	1:1000	5% BSA-TBST
Anti-Smad7	5% Milch-TBST	1:500	5% Milch-TBST
Anti-Smurf2	5% Milch-TBST	1:500	5% Milch-TBST
Anti-TBP	5% Milch-TBST	1:1000	5% BSA-TBST
Anti-TGF- $\beta$	5% Milch-TBST	1:1000	5% BSA-TBST
Anti-VDR	5% Milch-TBST	1:500	5% Milch-TBST
Anti- $\alpha$ -SMA	5% Milch-TBST	1:1000	5% Milch-TBST
Anti- $\beta$ -Aktin (C4)	5% Milch-TBST	1:10000	5% Milch-TBST

**Tabelle 6: Sekundärantikörper und ihre Verwendung**

Antikörper	Blockierungspuffer	Verdünnung	Antikörperpuffer
anti-rabbit IgG-HRP	5% Milch-TBST	1:5000	5% Milch-TBST
anti-sheep IgG-HRP	5% Milch-TBST	1:5000	5% Milch-TBST
anti-mouse IgG-HRP	5% Milch-TBST	1:5000	5% Milch-TBST
anti-goat IgG-HRP	5% Milch-TBST	1:5000	5% Milch-TBST
anti-rat IgG-HRP	5% Milch-TBST	1:5000	5% Milch-TBST

#### **2.2.9.5.4 Entfernung der gebundenen Antikörper**

PVDF-Membranen erlauben die sukzessive Detektion mehrerer Proteine. Nach jeder Detektion war es erforderlich, die Membran wieder in ihren Ursprungszustand zurück zu versetzen. Durch dieses Verfahren wurde durch eine weitere Detektion sowohl die gleichmäßige Beladung des Gels mittels Referenz-Genprodukt GAPDH, als auch der Gesamtproteingehalt bei Phosphorylierungsuntersuchungen überprüft.

Bevor die Membran mit einem neuen Antikörper inkubiert werden konnte, musste der noch gebundenen Primär-Sekundär-Antikörperkomplex entfernt werden („*Stripping*“). Im ersten Schritt wurden in drei fünfminütigen Waschschritten mit TBST eventuell verbliebene ECL-Reste entfernt. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation der Membran in Stripping-Puffer bei RT unter ständigem Schütteln. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran mit einem neuen Antikörper inkubiert und neu detektiert (2.2.9.5.3).

#### **2.2.9.5.5 Anfärbung des SDS-PAGE-Gels mit Coomassie**

Neben der Ponceau S-Färbung an den PVDF-Membranen wurden auch die Gele mit Coomassie angefärbt, um einen ersten Hinweis auf eine gleichmäßige Beladung des Gels zu erhalten. Hierfür wurden diese für 20-45 min bei RT in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit der Coomassie-Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

#### **2.2.10 Bestimmung der Serumparameter ALT, AST und FFA**

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen wurden die Serumparameter ALT und AST mittels Festphasen-Immunfluoreszenz Chromatographie nach Standardmethoden [ALT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)) FS (IFCC mod.); (AST (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)) FS (IFCC mod.))] gemessen.

#### **2.2.11 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay)**

Zum Nachweis sezernierter Proteine in Seren und Zellkulturüberständen wurden ELISA/EIA-Bestimmungen durchgeführt. Alle durchgeführten Bestimmungen erfolgten nach den jeweiligen Herstellerprotokollen.

Mittels *25-Hydroxyvitamin D EIA Kit* wurden einerseits die 25-OH-VD-Serumkonzentrationen der Kontrollpatienten und NAFLD-Patienten gemessen und andererseits die Fähigkeit der pHSCs zur Metabolisierung des VD<sub>2</sub> zu 25-OH-VD<sub>2</sub> nachgewiesen.

Im Serum der NAFLD-Patienten und Kontrollen erfolgte die Quantifizierung der Apoptose unter Verwendung des *M30-Apoptosense ELISA Kits*, die Messung des

proinflammatorischen Chemokins Rantes mittels Quantikine *human CCL5/Rantes ELISA-Kit* und die Bestimmung der FFA-Serumkonzentration unter Verwendung des NRFA-C Kits.

Des Weiteren wurde sowohl in Patientenseren als auch in Überständen mit FFAs und VD<sub>2</sub> behandelter pHSCs die Konzentration Chemokins MCP-1 mittels *Quantikine human MCP-1 ELISA-Kit* ermittelt.

## **2.2.12 Histologische Nachweismethoden**

### **2.2.12.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Die als Übersichtsfärbung angewendete Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung färbt basophile Zellbestandteile (Zellkerne) mittels Hämatoxylin blau und azidophile Strukturen (v.a. Proteine, Zytoplasma) rot. Hierfür wurden die anzufärbenden Paraffinschnitte für 30 min im Wärmeschrank inkubiert, mit Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe von 100% bis 50% rehydriert. Die mit Hämatoxylin-Lösung gefärbten Schnitte wurden im fließenden Wasser gebläut und anschließend mit Eosin gegengefärbt. Nach Spülen der Objektträger in Wasser, wurden diese durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 50% bis 100% entwässert, anschließend mit Eukitt eingedeckt und lichtmikroskopisch dargestellt.

### **2.2.12.2 Nile Red-Färbung an pHSC**

Die morphologische Darstellung der Aufnahme und Speicherung von FFAs in behandelte pHSCs wurde über die Färbung von Zellen mit Nile Red, einem lipophilen, fluoreszierenden Phenoxazin-Farbstoff, umgesetzt. Hierfür wurden je zu  $0,2 \times 10^5$  pHSCs pro Kammer eines Objektträgers ausgesät und, wie unter 2.2.6.1 beschrieben, für 24 h mit FFAs und VD<sub>2</sub> behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gespült und anschließend für 15 min bei RT mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss folgte nach dreimaligem Waschen für je 10 min in PBS eine einstündige Inkubation der Zellen in einer 12,5 µg/mL Nile Red PBS-Färbelösung unter kontinuierlichem Schütteln bei RT. Danach wurden die Zellen dreimal für je 10 min in PBS gewaschen und mit einem DAPI-haltigem Eindeckmedium bedeckt, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels Laser Scanning-Mikroskopie (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland).

### **2.2.12.3 Sirius Red-Färbung**

Die Sirius Red-Färbung wurde durchgeführt, um histologisch Kollagen im Lebergewebe darzustellen. Bei dieser sehr sensitiven Methode stellen sich die Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelblich erscheinen. Zunächst erfolgte die Inkubation der Schnitte für 30 min im Wärmeschrank, die Entparaffinierung mittels Xylol und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100→50%). Nach je zweimaligem Waschen der Objektträger in PBS folgte eine 2-stündige Inkubation der Schnitte in einer Sirius Red-Färbelösung (0,1%). Nach anschließendem dreimaligem Waschen in PBS und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50→100%), wurden die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckt. Die Kollagendeposition wurde lichtmikroskopisch dargestellt.

### **2.2.12.4 Immunfluoreszenzfärbungen**

Die Immunfluoreszenzfärbung diente sowohl dem Nachweis der Expression bestimmter Proteine im Lebergewebe als auch der morphologischen Charakterisierung der subzellulären Lokalisation eines Proteins und der Proteinexpression in der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl direkte als auch indirekte Immunfluoreszenzen durchgeführt. Während das jeweilige Antigen bei der direkten Immunfluoreszenz durch einen spezifischen, Fluorochrommarkierten Antikörper unmittelbar detektiert wird, erfolgt der Antigennachweis bei der indirekten Immunfluoreszenz nach Belegung des Antigens mit einem Primärantikörper über einen Fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper. Neben der veränderten  $\alpha$ -SMA-Expressionsbestimmung im Lebergewebe wurden die isolierten pHSCs in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz identifiziert (s. nachfolgende Abschnitte).

#### **2.2.12.4.1 Direkte $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenzfärbung im Lebergewebe**

Die für diesen Nachweis verwendeten Paraffinschnitte wurden für 30 min bei 56°C im Wärmeschrank inkubiert, durch Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (100→50%) rehydriert. Anschließend folgten eine 10-minütige Inkubation der Objektträger in 10 mM Natriumcitratpuffer mit 0,05% Tween 20 bei 80°C, eine 15-minütige Inkubation der Schnitte in „*Blocking Reagenz*“ und eine 15-minütige Inkubation mit „*Serumblock Reagenz*“ (ABD serotec, Düsseldorf). Die direkte Immunfluoreszenzfärbung mit  $\alpha$ -SMA-FITC Antikörper (1:500 in 5% BSA-PBST) fand bei 4°C unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer über Nacht statt. Am darauffolgenden Tag wurden der überschüssige und nicht gebundene Antikörper in drei Waschschritten von je 5 min entfernt. Im Anschluss wurden die Präparate mit

einem DAPI-haltigen, wässrigen Eindeckmedium versehen, mit Nagellack luftdicht versiegelt und mittels Laser Scanning-Mikroskopie ausgewertet.

#### **2.2.12.4.2 Identifikation der isolierten pHSC mittels Immunfluoreszenz**

Die erfolgreiche Aufreinigung von pHSCs wurde über ihre  $\alpha$ -SMA-Expression nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte der Ausschluss der Anwesenheit von Hepatozyten, KCs und/oder LSECs. An den pHSCs wurden alle Einzelnachweise durchgeführt. Zusätzlich dienten KCs (CD146-FITC), LSECs (CD163-APC) und Hepatozyten (Albumin) als Positiv-Kontrollen der jeweiligen Färbungen.

Die für diese Färbung auf Objektträger ausgesäten pHSCs, KCs, LSECs und Hepatozyten wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80% in ihren jeweiligen Wachstumsmedien kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gespült, für 10 min bei 4°C mit eiskaltem Methanol/Azeton-Gemisch (50/50) fixiert und zuletzt dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Bei allen Färbungen wurden unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation mit einer Blockierlösung bei RT in einer feuchten Kammer abgesättigt. Für den Nachweis der  $\alpha$ -SMA- und Albumin-Expression erfolgte vorher eine 30-minütige Permeabilisierung der Zellen durch eine 0,1%ige Triton/PBS-Lösung in einer feuchten Kammer bei RT. Im Anschluss folgte eine mindestens 12-stündige Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die jeweiligen Blockierungspuffer, Verdünnungen der Primärantikörper und Antikörperpuffer finden sich in Tabelle 7.

**Tabelle 7: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz**

<b>Antikörper</b>	<b>Blockierungspuffer</b>	<b>Verd.</b>	<b>Antikörperpuffer</b>
$\alpha$ -SMA-FITC	1:100 F <sub>cR</sub> -Block/PBS	1:100	1:100 FcR-Block/0,3% Triton/PBS
CD 163-FITC	1:100 F <sub>cR</sub> -Block/PBS	1:200	1:100 FcR-Block/PBS
CD 146-APC	1:100 F <sub>cR</sub> -Block/PBS	1:100	1:100 FcR-Block/PBS
Albumin	2% BSA/PBS	1:100	2% BSA/0,3 % Triton/PBS

Am folgenden Tag wurden alle Zellen dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Mit Ausnahme des Einzelnachweises der Albumin-Expression wurden die Zellen im Anschluss mit DAPI-haltigem Eindeckmedium bedeckt und mittels Nagellack luftdicht verschlossen. Der Nachweis einer Albumin-Expression in den Zellen benötigte zur Detektion eine 2-stündige Inkubation der Zellen bei RT unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer mit dem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper anti-mouse-IgG<sub>2a</sub>-APC (Verd.: 1:2000) in einer 2% BSA/ 0,3% Triton/ PBS-Lösung. Vor dem Eindecken der Zellen mit DAPI-haltigem Medium und der luftdichten Versiegelung

mittels Nagellack wurden die Zellen nochmals dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Neben den Positiv-Kontrollen wurden für jeden Einzelnachweis Negativ-Kontrollen mitgeführt. Die Immunfluoreszenzauswertung erfolgte mittels Laser Scanning-Mikroskopie.

### **2.2.13 Nachweis von Einzelnukleotid-Polymorphismen**

#### **2.2.13.1 Genomische DNA-Präparation**

Für die Analyse bekannter SNPs im VDR-Gen (VDR-SNP) wurden isolierte phHSC von 54 Patienten in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche im HSC-Wachstumsmedium kultiviert. Bei Erreichen einer über 90%-igen Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen, bei 300 g für 10 min bei RT zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Isolation der genomischen DNA diente das *QIAamp DNA min Kit* der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde das Pellet in 300 µL PBS resuspendiert und mit 30 µL Proteinase K und 300 µL Lysisbuffer versetzt. Durch mehrmaliges Aspirieren und Injizieren der Zellsuspension mit einer 1 mL-Spritze und einem 27G-Kanülenaufsatz erfolgte die Lyse der Zellen. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 56°C wurden die Proben mit 300 µL 100%-igen Ethanol versetzt, gemischt und mittels Silikatsäule aufgereinigt. Nach Bindung der DNA an der Membran und mehreren Waschschritten wurde die DNA mit 100 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Ihre Konzentration und Reinheit wurde photometrisch ermittelt und auf 50 ng/µL eingestellt. Vor Analyse der VDR-SNPs erfolgte die Überprüfung der DNA-Qualität mittels Albumin-Kontroll-PCR (Albumin, „forward“-Primer: 5'-GCCCTCTGCTAACA AGTCCTAC-3', „reverse“-Primer: 5'-GCCCTAAAAAGA AAATCCCCAATC-3', PCR-Produktgröße: 350 bp).

#### **2.2.13.2 PCR VDR-SNPs**

Die unter 2.2.13.1 generierten genomischen DNA-Proben wurden auf Vorkommen der im VDR-Promotor befindlichen SNPs (cdx-2, Gata-3, G-1520C), in Exons vorhandenen SNPs (FokI, Taq<sup>a</sup>I) und in Introns liegenden SNPs (Apa, BsmI, DdeI, Tru9I) untersucht. Zu den verwendeten Primersequenzen s. Tabelle 8.



**Tabelle 8: SNP, Lokalisation, Primersequenz und PCR-Produktgröße**

SNP, rs-Nr.	Lokali- sation, Position	Primer		PCR- Produkt- größe
		„Forward“-Sequenz	„Reverse“-Sequenz	
cdx-2, 11568820	Promotor, 48302545	5'-GGAAGGAAAAGA GGATAGAGA-3'	5'-AGCAATGAAAGC AAACCAAG-3'	180 bp
GATA-3, 4516035	Promotor, 48299826	5'-CCTCCTCTGTAAG AGGCGAATAGCGAT-3'	5'-GGACAGGTGAAA AAGATGGGGTTC-3'	179 bp
G-1520C, 7139166	Promotor, 48300334	5'-TGCAGAGAATGTC CCAAGGT3	5'-GTCCTGCCAGT CTGATGGAT-3'	160 bp
FokI, 2228570	Exon 2, 48272895	5'-GGCCTGCTTGCTG TTCTTAC-3'	5'-TGCTTCTTCTCC CTCCCTTT-3'	221 bp
Taq <sup>al</sup> , 731236	Exon 9, 48238757	5'-TGTACGTCTGCAGT GTGTTGG-3'	5'-CTGCCGTTGAGT GTCTGTGT-3'	175 bp
Apal, 7975232	Intron 8, 48238837	5'-GCACGGGGATAGA GAAGAAG-3'	5'-GGATCCTAAATG CACGGAGA-3'	187 bp
Bsml, 1544410	Intron 8, 48239835	5'-GGTGGGACTGAAG AAGCTGAAC-3'	5'-CTTTGGACCTCA TCACCGACAT-3'	613 bp
Ddel, 3782905	Intron 2, 48266167	5'-AAGACATGGTGTCT GCTTCA-3'	5'-GGTTAGATCGAT ATGTTTGA-3'	304 bp
Tru9I, 757343	Intron 8, 48239675	5'-CAGAGTGTGCAGG CGATT-3'	5'-CCCTCTTTGGAC CTCATCAC-3'	339 bp

Die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes wurden jeweils mit einem auf die Probenzahl bezogenen Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Mastermix**

Albumin, cdx-2, GATA-3, G-1520C, Ddel	Komponenten des Mastermixes	Apal, Bsml, FokI, Taq <sup>al</sup> , Tru9I
2,0 µL	PCR-Puffer 10x	2,0 µL
1,6 µL	MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,6 µL
---	Q-Solution 5x	4,0 µL
0,4 µL	dNTPs [10 mM]	0,4 µL
0,4 µL	„Forward“ Primer [10 mM]	0,4 µL
0,4 µL	„Reverse“ Primer [10 mM]	0,4 µL
0,1 µL	HotStarTaq	0,1 µL
14,1 µL	RNase-freies Wasser	10,1 µL

Pro 19 µL des hergestellten Mastermixes wurde 1 µL der zu untersuchenden DNA zugegeben. Die Amplifizierung erfolgte im den Eppendorf vapoProtect Cyclor in 45 Zyklen nach folgendem Protokoll:

	5 min	95°C	
45 Zyklen	1 min	95°C	
	1 min		55-64°C Primer-abhängig
	1 min	72°C	
	10 min	72°C	
	unendlich	4°C	

Die Annealingtemperatur des jeweilig verwendeten Primerpaars wurde zuvor mittels Gradienten-PCR ermittelt (vgl. Tabelle 10).

**Tabelle 10: SNP und Annealingtemperatur**

SNP bzw. Albumin	Annealingtemperatur
cdx-2	57°C
GATA-3	57°C
G-1520C	58°C
FokI	58°C
Taq <sup>al</sup>	60°C
Apal	60°C
Bsml	62°C
Ddel	55°C
Tru9I	64°C
Albumin	61°C

Bevor das entstandene PCR-Produkt für die Restriktion verwendet werden konnte, musste seine Richtigkeit kontrolliert werden. Dazu wurden je 3 µL PCR-Probe auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen, für 40 min bei 70 V aufgetrennt und anschließend mittels UV-Licht überprüft (s. Folgeabschnitt).

### 2.2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese kann neben der Überprüfung der Reinheit hergestellter PCR-Produkte auch der Restriktionsverdau anhand der entsprechend richtigen Fragmentgröße kontrolliert werden. Die optische Darstellung erfolgt nach Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert, unter UV-Licht.

Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus wurden Gele unterschiedlicher Agarose-Konzentrationen hergestellt (2%: Albumin, Bsml, Tru9I, Ddel; 2,5%: FokI; 3%: Apal, Taq<sup>al</sup>; 3,5%: cdx-2, GATA-3, G-1520C). Die Herstellung der Agarose-Gele erfolgte aus Topvision Agarose, TBE-Puffer und einer 0,0025%-igen Ethidiumbromid-Lösung (5 Tropfen/ 100 µL Agarose). Nach der Polymerisation des Agarose-Gels schloss sich die Beladung mit den in 2 µL 6x *Loading Dye Buffer* versetzten Proben an. Die Fragmentgrößen-Überprüfung fand mittels DNA-Größenmarker (*DNA-Ladder*) statt.

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente bei  $U = 70 \text{ V}$  erfolgte die Auswertung der Gele mittels UV-Licht im Geldokumentationsgerät Peqlab E-box VX2.

#### 2.2.13.4 Restriktionsverdau zur SNP-Analyse

Unter Verwendung spezifischer Restriktionsendonukleasen wurden die PCR-Produkte auf mögliche VDR-SNPs untersucht. In der zu untersuchenden Sequenz erfolgte die Suche nach einer Teilsequenz, in der ein Restriktionsenzym nur dann schnitt, wenn ein bestimmter Nukleotidaustausch vorlag. Somit konnte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand der DNA-Fragmente überprüft werden, ob es sich bei der Probe um einen Wildtyp, ein heterozygotes oder homozygotes SNP handelte.

Im Einzelnen wurden bei der Untersuchung der verschiedenen VDR-SNPs Restriktionsenzyme mit den dazugehörigen optimalen Pufferbedingungen (nach Herstellerangaben) verwendet (s. Tabelle 11).

**Tabelle 11: SNP und Restriktionsenzyme**

Reagenzien	cdx-2	GATA-3	G-1520C
NEB-Puffer 10x	1 µL Puffer 4	1 µL Puffer 3	1 µL Puffer 4
BSA 100x		0,15 µL	0,15 µL
PCR-Produkt	6 µL	6 µL	6 µL
Restriktionsenzym	1 µL HpyCH4III [5 U/µL]	0,5 µL EcoRV [10 U/µL]	1 µL NlaIII [10 U/µL]
ddH <sub>2</sub> O	7 µL	7,35 µL	6,85 µL

Reagenzien	FokI	Taq <sup>q</sup> I	Apal
NEB-Puffer 10x	1 µL Puffer 4	1 µL Puffer 4	1 µL Puffer 4
BSA 100x		0,15 µL	0,15 µL
PCR-Produkt	6 µL	6 µL	6 µL
Restriktionsenzym	1 µL FokI [4 U/µL]	1 µL Taq <sup>q</sup> I [20 U/µL]	0,4 µL Apal [50 U/µL]
ddH <sub>2</sub> O	7 µL	6,85 µL	7,45 µL

Reagenzien	BsmI	DdeI	Tru9I
NEB-Puffer 10x	1 µL Puffer 4	1 µL Puffer 3	1 µL Puffer 4
BSA 100x			0,15 µL
PCR-Produkt	6 µL	6 µL	6 µL
Restriktionsenzym	1 µL BsmI [10 U/µL]	1 µL DdeI [10 U/µL]	0,25 µL MseI [12,5 U/µL]
ddH <sub>2</sub> O	7 µL	7 µL	7,6 µL

Unter den vom Hersteller vorgegebenen Bedingungen erfolgte der Restriktionsverdau. Zur Überprüfung der möglichen VDR-SNPs wurden je 3 µL unverdautes und 15 µL verdautes PCR-Produkt auf ein Agarosegel überführt und, wie unter 2.2.13.3 beschrieben, weiter untersucht. Tabelle 12 können die VDR-SNPs mit den zugehörigen Fragmentgrößen entnommen werden.

**Tabelle 12: SNP und Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau**

SNP	PCR-Produktgröße
cdx-2	AA = 145 bp GG = 94 + 51 + 35 bp
GATA-3	GG = 179 bp AA = 152 + 27 bp
G-1520C	GG = 160 bp CC = 90 + 70 bp
FokI	CC = 221 bp TT = 185 + 36 bp
Taq <sup>al</sup>	TT = 175 bp CC = 133 + 42 bp
Apal	AA = 187 bp CC = 144 + 43 bp
BsmI	GG = 613 bp AA = 357 + 256 bp
Ddel	GG = 304 bp CC = 223 + 81 bp
MseI=Tru9I	GG = 339 bp AA = 237 + 102 bp

Die VDR-SNP-Analysen wurden freundlicherweise von Frau Mechthild Beste durchgeführt und mir zur Verfügung gestellt. Zusätzlich erfolgte eine nicht-parametrische Analyse der VDR-SNP mit den einzelnen PCR- und Western-Blot-Experimenten, welche freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Jochum mit dem Programm IBM SPSS-Statistics Version 19 (IBM; Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt wurde.

## 2.2.14 Statistik

Für alle statistischen Berechnungen, Auswertungen und graphischen Darstellungen wurde das Programm Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Alle Daten wurden, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  *standard error of the mean* (SEM) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden zwischen zwei unterschiedlich behandelten Gruppen mittels ungepaartem Student's *t*-Test ermittelt und ab einem Signifikanzniveau von  $p < 0,5$  angegeben. Für signifikant unterschiedliche Varianzen erfolgte eine Welch's-Korrektur. Statistische

Ausreißer wurden mit dem Grubb-Test ermittelt und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Stichprobenumfänge (n) beziehen sich bei *in vitro*-Untersuchungen auf die Anzahl der unabhängigen Experimente und bei *ex vivo*-Analysen auf die Anzahl der Patienten in den einzelnen Gruppen. In der nicht-parametrischen Analyse der VDR-SNP korreliert der Spearman-Rho Koeffizient ( $p < 0,05$ ) die VDR-SNP mit Fibrose-relevanten Parameten.

### 3 Ergebnisse

In diesem Ergebnisteil werden die unter 1.11 gestellten Fragen aufgeteilt nach den Teilabschnitten: „*Ex vivo*-Analyse von Seren und Leberbiopsien von NAFLD-Patienten“ und „Zellkulturmodell mit isolierten primären hepatischen Sternzellen“ beantwortet.

Im Teilabschnitt zu den NAFLD-Patienten wurden neben der Charakterisierung der einzelnen Gruppen der VD-Status und die VDR-Expression ermittelt. Des Weiteren wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Progression der NAFLD auf molekularer Ebene einen Einfluss auf profibrotische und proinflammatorische Parameter hat.

Das Teilprojekt der *in vitro*-Untersuchungen an pHSC sollte näheren Aufschluss über den Einfluss von Vitamin D<sub>2</sub> bezüglich Entzündung und Fibrose geben. Hierzu erfolgte im ersten Schritt die Untersuchung der Wirkung von Vitamin D<sub>2</sub> auf FFA- bzw. TGF- $\beta$ -vorstimulierte pHSC. Zur Evaluierung, in wiefern eine supprimierte VDR-Expression einen Einfluss auf die Vitamin D<sub>2</sub>-Wirkung und das TGF- $\beta$ -Signal in pHSC ausübte, wurde mittels RNA-Interferenz die VDR-Expression unterdrückt. Hierzu sollten auf molekularer Ebene neben Entzündungs- und Fibrosemarkern auch die Änderungen bestimmter mitwirkender Signalwege überprüft werden.

Zusätzlich sollte mit Hilfe der Analyse der Einzelnukleotid-Polymorphismen im VDR-Genom untersucht werden, ob dadurch in pHSC das Ausmaß der Entzündung und der Fibrose beeinflusst wird.

#### 3.1 *Ex vivo*-Analysen von Seren und Leberbiopsien von NAFLD-Patienten

Dieser Abschnitt umfasst die Untersuchungen der Veränderungen hinsichtlich Fibrose, Inflammation, Vitamin D-Metabolismus und VDR-Expression in NAFLD-Patienten.

##### 3.1.1 Charakterisierung und Serologie von NAFLD-Patienten

Die Hepatozytenapoptose wird als Hauptmechanismus des Leberschadens und des Zelltodes in Patienten mit einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) angesehen (Adams *et al.*, 2011; Alkhouri *et al.*, 2011). Die gesteigerte Apoptoserate in

NASH-Patienten im Vergleich mit Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettleber (NAFL) kann im Serum anhand des Caspase-gespaltenen Cytokeratin 18-Fragmentes (mittels M30-Antikörper-ELISA) detektiert werden (Adams *et al.*, 2011). Somit wurde in dieser Arbeit das Gesamtkollektiv an NAFLD-Patienten (n = 83) in die Untergruppen NAFL (n = 39) und NASH (n = 43) separiert.

Als M30-Grenzwert diente der von der Arbeitsgruppe Feldstein (Feldstein *et al.*, 2009) ermittelte Wert von 275 U/L, der NAFL- und NASH-Patienten voneinander abgrenzt (vgl. auch Fußnote zu Tab. 13). Im ersten Schritt erfolgte die Analyse der allgemeinen Charakteristika (z.B. Alter, Gewicht und Leberenzyme) in den einzelnen Untergruppen (vgl. Tabelle 13).

**Tabelle 13: allgemeine Charakteristika der Kohorten**

	<b>Kontrollen (n = 10)</b>	<b>NAFL (n = 39)</b>	<b>NASH (n = 43)</b>
Geschlecht	f : m = 3 : 7	f : m = 32 : 7	f : m = 33 : 10
Alter (Jahre)	26 ± 7.6	40.0 ± 1.6	43.1 ± 1.8
Gewicht (kg)	69.7 ± 16.1	150.5 ± 4.2 *	158.8 ± 4.2 *
Größe (cm)	171.4 ± 11.5	171.0 ± 1.5	170.9 ± 3.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.5 ± 1.3	50.7 ± 1.4 *	52.9 ± 1.4 *
AST (U/L)	24.5 ± 1.7	28.5 ± 2.7	36.1 ± 3.4 *
ALT (U/L)	28.7 ± 2.8	30.7 ± 2.7	47.7 ± 4.9 * #
Gesamt-Bilirubin (mg/dL)	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.05	0.5 ± 0.02
Serumcholesterol (mg/dL)	141.3 ± 17.3	194.4 ± 5.2 *	192.9 ± 4.9 *
HbA1c (%)	3.1 ± 0.8	5.6 ± 0.1 *	6.0 ± 0.2 *

Die NAFLD-Patienten wurden mittels M30 (Grenzwert von 275 U/L) in zwei Untergruppen separiert (M30 < 275 U/L = NAFL, M30 ≥ 275 U/L = NASH).

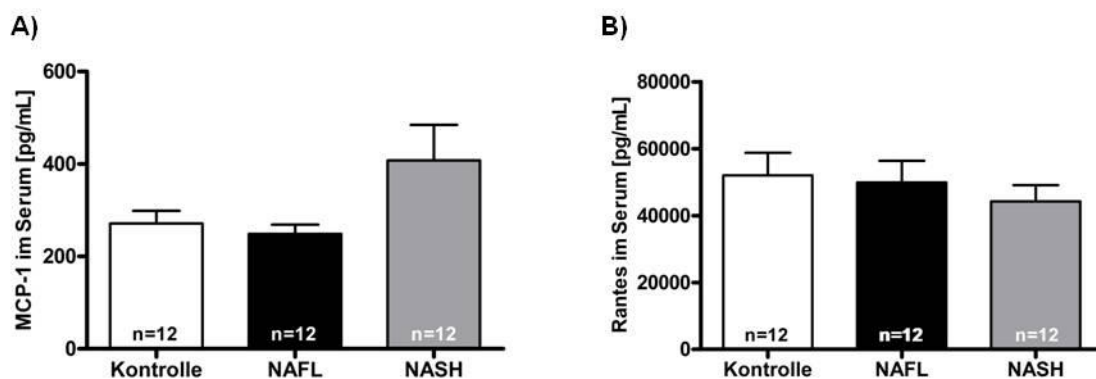
\* Signifikant (p < 0,05) im Vergleich zur Kontrolle

# signifikant (p < 0,05) im Vergleich zur NAFL

In der Geschlechterverteilung in dieser NAFLD-Patientenkohorte war die Prävalenz an Frauen stark erhöht (NAFL: 82%, NASH: 77%). Die in der IDF festgelegten Kriterien, welche eine NAFLD kennzeichnen, stimmen mit den gesammelten Daten dieser Patientenkohorte überein (Anty *et al.*, 2011; Vanni *et al.*, 2010). Sowohl die NAFL-Patienten als auch die NASH-Patienten zeigten signifikant Erhöhungen des BMI (Ko vs. NAFL: p < 0,0001; Ko vs. NASH: p < 0,0001) und des Gesamtcholesterins

(Ko vs. NAFL:  $p = 0,0148$ ; Ko vs. NASH:  $p = 0,0167$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Bestimmung des Parameters HbA1c, welcher einen Rückschluss auf die Blutglukosekonzentration der letzten sechs bis acht Wochen gestattet, wurde in der gesamten NAFLD-Patientenkohorte gegenüber der Kontrolle (Ko vs. NAFL:  $p = 0,0127$ ; Ko vs. NASH:  $p = 0,0056$ ) ein signifikanter Anstieg verzeichnet. Die Messungen der leberspezifischen Enzyme AST und ALT zeigten ausschließlich in der NASH-Kohorte im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte Serumkonzentrationen (AST:  $p = 0,0036$ ; ALT:  $p = 0,0015$ ). Diese Beobachtungen werden durch frühere Publikationen bestätigt (Tsukada *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2012). Interessanterweise wurde eine signifikante Differenz in der Serumkonzentration des leberspezifischen Enzyms ALT zwischen der NAFL- und der NASH-Gruppe ( $p = 0,0037$ ) gefunden. Der Serumparapeter Gesamt-Bilirubin wies keinen Unterschied zwischen Kontrolle und NAFLD auf.

Ein weiteres Kennzeichen der NAFLD-Progression – die Inflammation – wurde mittels der proinflammatorischen Zytokine MCP-1 und Rantes bestimmt. In der progredienten NAFLD-Gruppe (NASH) war lediglich das Zytokin MCP-1 tendenziell im Bezug zur Kontrolle angestiegen (Abbildung 8 A). Dieses Zytokin könnte ein möglicher neuer Differenzierungsmarker zwischen NAFL und NASH sein, da bei dieser Patientenanzahl eine deutlichen Differenz ( $p = 0,0685$ ) beobachtet wurde (Abbildung 8 A). Demgegenüber wurde keine Änderung der Rantes-Serumkonzentration beobachtet (Abbildung 8 B). Somit scheint Rantes kein geeigneter Parameter zur Unterscheidung der unterschiedlichen NAFLD-Schweregrade zu sein.

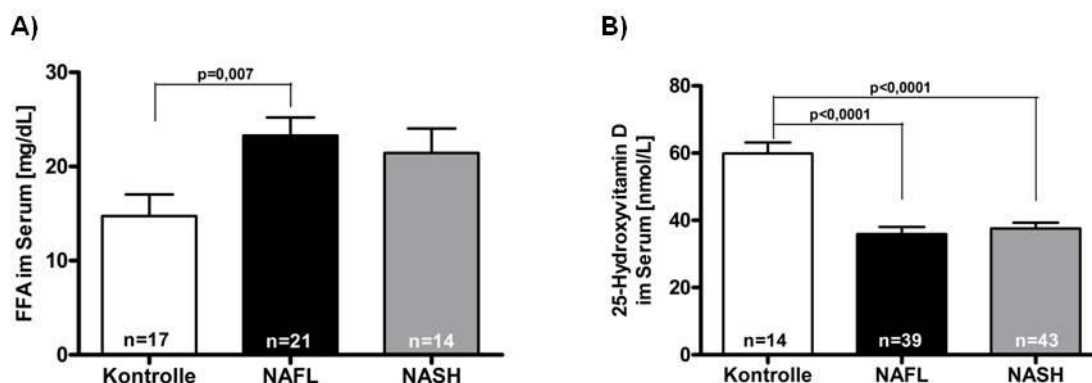


**Abbildung 8: Serumkonzentrationen von MCP-1 und Rantes in NAFLD-Patienten und Kontrollen.**

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Serumkonzentrationen von MCP-1 (A) und Rantes (B) in den Gruppen Kontrolle, NAFL und NASH. Die statistische Auswertung mittels ungepaartem Student's *t*-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Anzahl der Patienten kann den jeweiligen Balken entnommen werden.

Da die Akkumulation von Fetten in Hepatozyten ein Hauptcharakteristikum der NAFLD ist, wurde in den Seren der Patientenkohorte die Konzentration an freien Fettsäuren in Augenschein genommen. Des Weiteren erfolgte die Betrachtung des VD-Status' im Bezug auf die Progression der NAFLD.

Bei NAFLD-Patienten wurden erhöhte Serumkonzentrationen an freien Fettsäuren nachgewiesen (Ko vs. NAFL:  $p = 0,0070$ ; Ko vs. NASH:  $p = 0,063$ ), wobei sich die NAFL- und NASH-Gruppe nicht voneinander unterschieden (Abbildung 9 A). Zusätzlich zeigte sich eine verringerte 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration (Ko vs. NAFL:  $p < 0,0001$ ; Ko vs. NASH:  $p < 0,0001$ ) im Serum von NAFLD-Patienten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9 B). Eine Unterscheidung zwischen NAFL und NASH war daher mit keinem der beiden Parameter möglich.



**Abbildung 9: Serumkonzentrationen von FFA und 25-Hydroxyvitamin D in NAFLD- Patienten und Kontrollen.**

Graphisch dargestellt sind die Serumkonzentrationen von FFA (A) und 25-Hydroxyvitamin D (B) als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Aufteilung des Patientenkollektivs erfolgte in drei Gruppen: Kontrolle, NAFL und NASH. Die Anzahlen der Patienten kann den jeweiligen Balken entnommen werden. Die Signifikanzen der statistischen Auswertung mittels ungepaartem Student's  $t$ -Test sind den Graphen entnehmbar. Die NAFLD war assoziiert mit einer gesteigerten FFA- und einer reduzierten VD-Serumkonzentration.

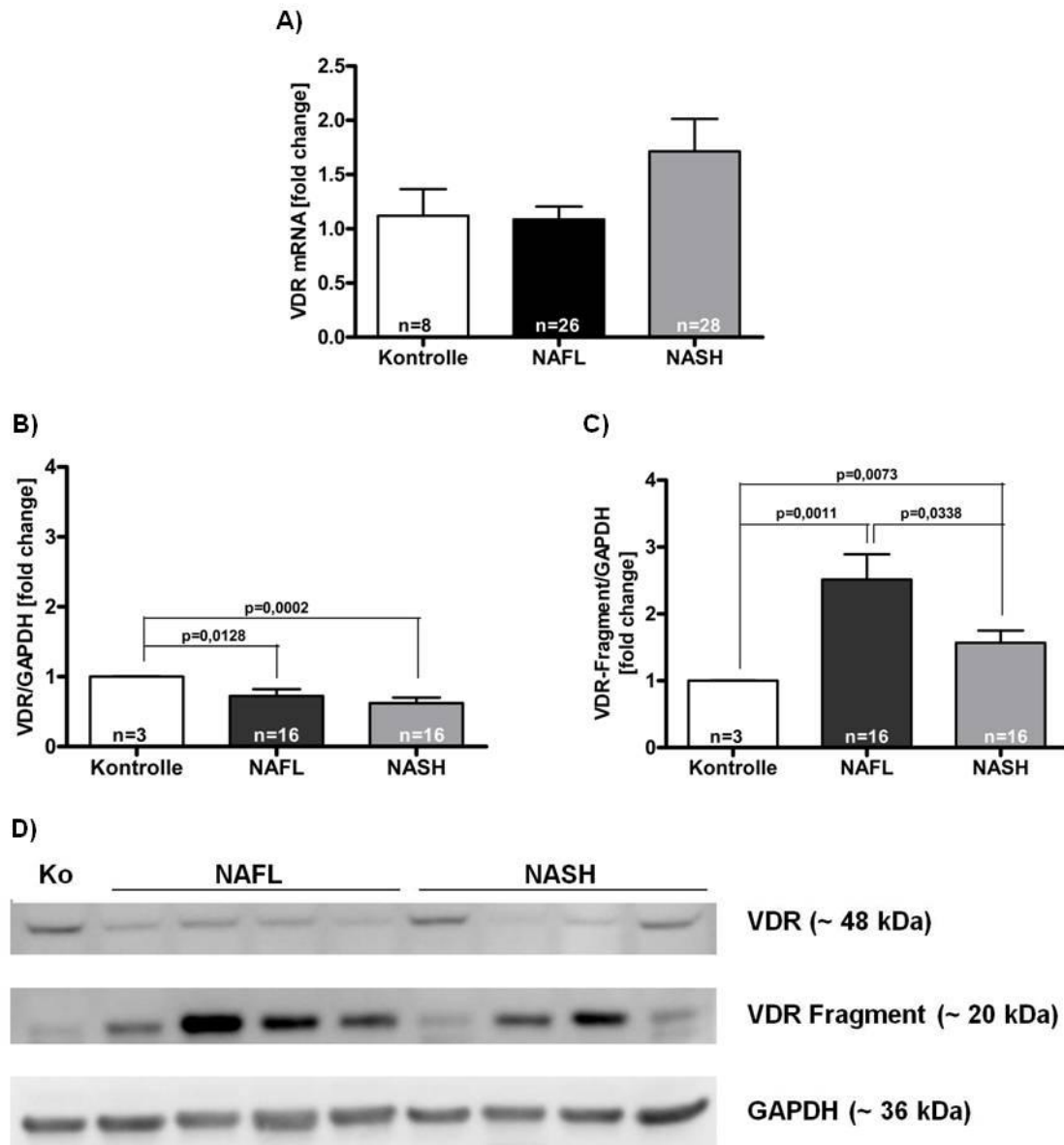
### 3.1.2 Analyse der VDR-Expression in NAFLD-Patienten

Da Vitamin D an den VDR binden muss, um genomisch wirken zu können, wurde der VDR auf mRNA- und Proteinebene gemessen, um eine mögliche Korrelation zwischen geringer VD-Serumkonzentration und der hepatischen VDR-Expression zu prüfen. Um die VDR-Expression im Lebergewebe der NAFLD-Patienten beurteilen zu können, dienten sowohl Spender- als auch kommerziell erworbene Leberbiopsien als Kontrollen.

Im Gegensatz zur signifikant verminderten VD-Serumkonzentration zeigte sich in den Leberbiopsien der NASH-Kohorte im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,11$ ) und NAFL-Gruppe ( $p = 0,059$ ) eine tendenziell vermehrte VDR-mRNA-Expression (Abbildung 10 A).



Erstaunlicherweise bestätigte sich das Ergebnis der hepatischen VDR-Genexpression nicht auf Proteinebene. In der Western-Blot Analyse zeigte sich in beiden NAFLD-Gruppen eine signifikant verminderte Expression des Gesamtlängen-VDR-Proteins (Ko vs. NAFL:  $p = 0,0128$ ; Ko vs. NASH:  $p = 0,0002$ ) (Abbildung 10 B, D).



**Abbildung 10: Hepatische VDR-Expression in NAFLD-Patienten und Kontrollen.**

Dargestellt ist die relative Expression der hepatischen VDR-mRNA (A), des Gesamtlängen-VDR-Proteins (B) und des VDR-Fragmentes (C) in Leberbiopsien von Kontrollen und NAFLD-Patienten. Diese sind angegeben als  $MW \pm SEM$ . (D) zeigt repräsentative Western-Blots der hepatischen VDR-Expression. Mittels ungepaartem Student's  $t$ -Test berechnete Signifikanzen und die Anzahl der Patienten sind den Abbildungen A-C zu entnehmen. NAFLD-Patienten wiesen eine reduzierte Expression des Gesamtlängen-VDRs und eine gesteigerte Expression des VDR-Fragmentes auf.

Der verwendete VDR-Antikörper, welcher das Epitop zwischen den Aminosäureresten 89 und 105 am C-terminalen Teil des humanen VDR erkennt, ermöglichte die

Detektion eines durch proteosomalen Abbau entstandenden 20 kDA schweren VDR-Fragmentes. Die Entstehung dieses Fragmentes untermauert die von Allegretto *et al.* (1987) publizierten proteosomale VDR-Degradation durch fehlende Ligandenbindung. Im Gegensatz zum VDR-Protein normaler Länge stieg in der gesamten NAFLD-Kohorte die Expression des VDR-Fragmentes signifikant an. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine 2,5-fach erhöhte Expression in der NAFL-Gruppe und eine 1,5-fach gesteigerte Expression in der NASH-Gruppe verzeichnet (Abbildung 10 C, D). Diese vermehrte Expression des VDR-Fragmentes war jedoch in der NAFL-Gruppe am deutlichsten ausgeprägt und sank signifikant mit der Progression der NAFLD ab (NAFL vs. NASH:  $p = 0,0338$ ) (Abbildung 10 C, D).

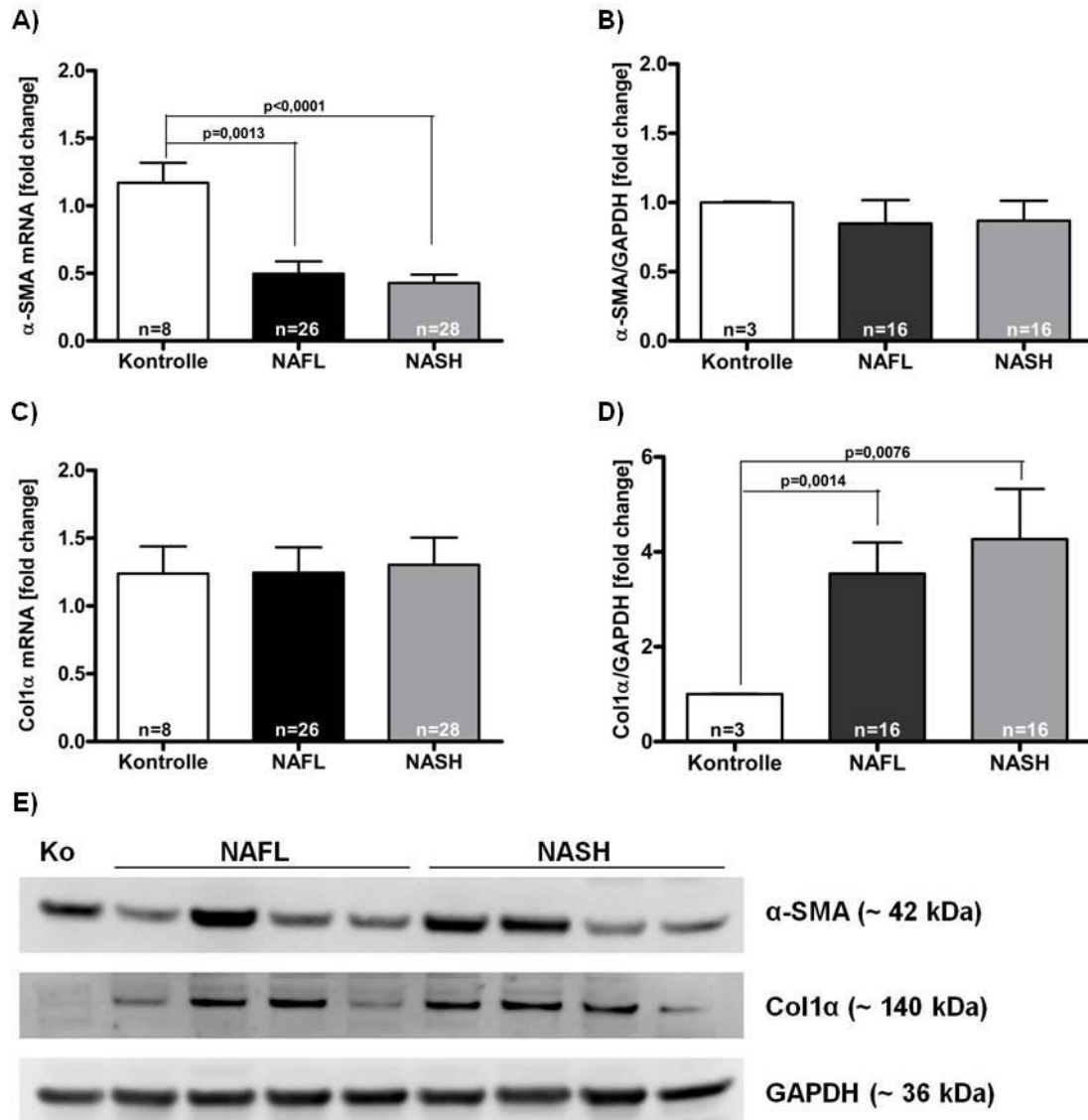
Die verminderte Vitamin D-Serumkonzentration und die veränderte VDR-Expression weisen darauf hin, dass die Bioverfügbarkeit von Vitamin D in den Leberzellen die Progression der NAFLD beeinflusst.

### **3.1.3 Expressionsanalyse der Strukturproteine Col1 $\alpha$ und $\alpha$ -SMA in NAFLD-Patienten**

Wie mehrfach beschrieben, ist die NASH charakterisiert durch Steatose, Inflammation und Fibrose im Leberparenchym. Ebenso konnte in einem Rattenmodell, in dem die Unterschiede zwischen NASH und einfacher Steatose untersucht wurden, gezeigt werden, dass Ratten mit einer befundeten NASH eine Steigerung der Lipidperoxidation, TGF- $\beta$ -mRNA, HSC-Aktivierung und Kollagen-Deposition aufwiesen (Tsukada *et al.*, 2006). Als fibrotische Strukturproteine wurden hier das Col1 $\alpha$  als Vertreter des fibrillären Kollagens (Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Tsukada *et al.*, 2006) und das  $\alpha$ -SMA als Transdifferenzierungsmarker für HSC (Friedman *et al.*, 2008a) untersucht.

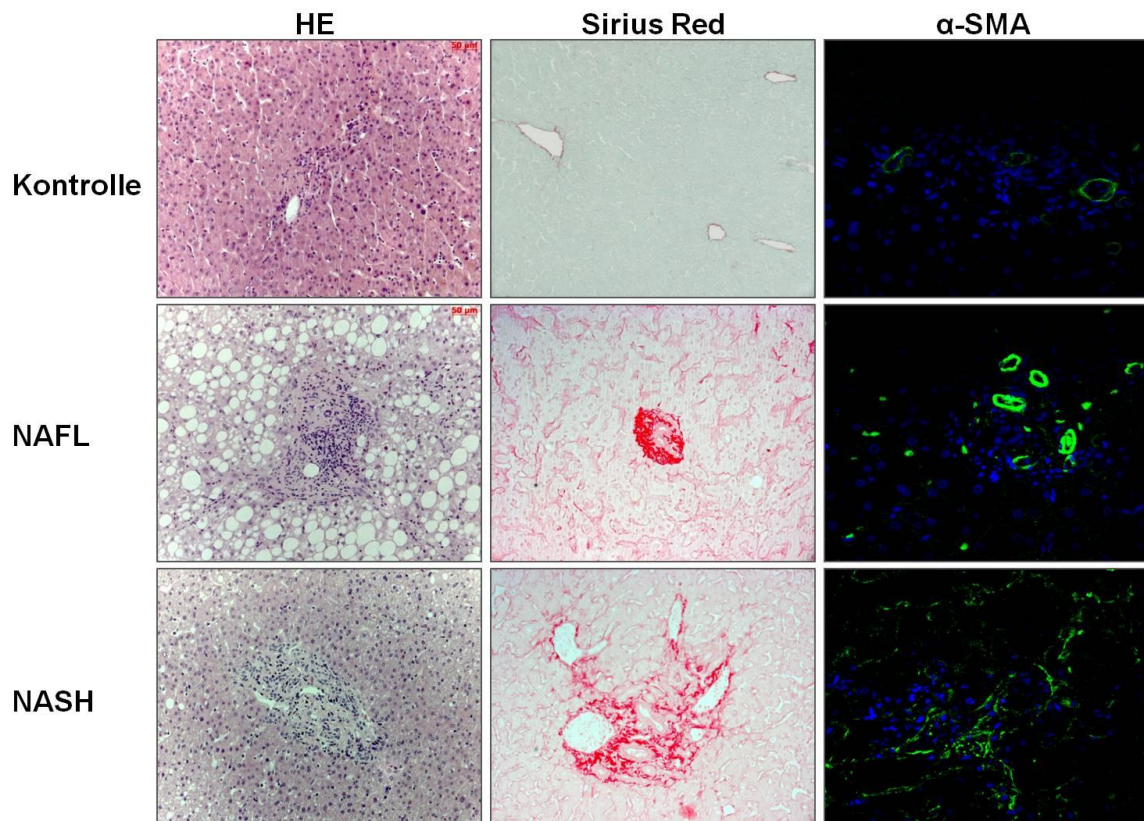
Die als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix angesehenen HSCs produzieren nach Aktivierung vermehrt das zytoskelettale Protein  $\alpha$ -SMA. Dies ließ vermuten, dass mit fortschreitender Fibrose ebenfalls ein Anstieg dieses Proteins detektierbar sein würde. Tatsächlich zeigte sich in der NAFLD-Kohorte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Verminderung seiner mRNA-Expression (Ko vs. NAFL:  $p = 0,0013$ ; Ko vs. NASH  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 11 A). Dieses Ergebnis spiegelte sich jedoch in der Proteinexpression nicht wieder, denn die Expression von  $\alpha$ -SMA im NAFLD-Patientenkollektiv war annähernd identisch derjenigen in der Kontrollgruppe (Abbildung 11 B, E). Die Visualisierung der HSC-Transdifferenzierung mittels  $\alpha$ -SMA-Immunfluoreszenzfärbung ermöglichte sowohl eine Aussage über die Stärke der Proteinexpression als auch über dessen zelluläre Verteilung. Wie in repräsentativen histologischen und

immunohistochemischen Untersuchungen zu sehen ist (Abbildung 12), veränderte sich die  $\alpha$ -SMA-Expression mit dem Fortschreiten der NAFLD im Bezug zur Kontrolle: im Gegensatz zum Kontrollgewebe zeigten NAFLD-Patienten neben der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression in portalen Bereichen bzw. in der Nähe von Gefäßen auch eine Expression im periportalen Gewebe (Abbildung 12). Des Weiteren wurde in Gewebe von NASH-Patienten eine deutliche Zunahme der periportalen Proteinexpression beobachtet (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Hepatische Expression von  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  in NAFLD-Patienten und Kontrollen.**

Abgebildet ist die relative hepatische mRNA-Expression von  $\alpha$ -SMA (A) und Col1 $\alpha$  (C); die relative Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA (B) und Col1 $\alpha$  (D) der densitometrischen Auswertung der Western-Blots (normalisiert auf GAPDH). Diese sind angegeben als MW  $\pm$  SEM. (E) zeigt repräsentative Western-Blots der hepatischen  $\alpha$ -SMA- und Col1 $\alpha$ -Expression. Signifikanzen des ungepaarten Student's *t*-Tests und die Anzahlen der Patienten sind den Abbildungen A-C zu entnehmen. Bei NAFLD-Patienten zeigte sich eine Korrelation zwischen Col1 $\alpha$  und dem Schweregrad der NAFLD.



**Abbildung 12: Histologische und immunhistochemische Darstellung der hepatischen Expression von Kollagen und  $\alpha$ -SMA in NAFLD-Patienten und Kontrolle.**

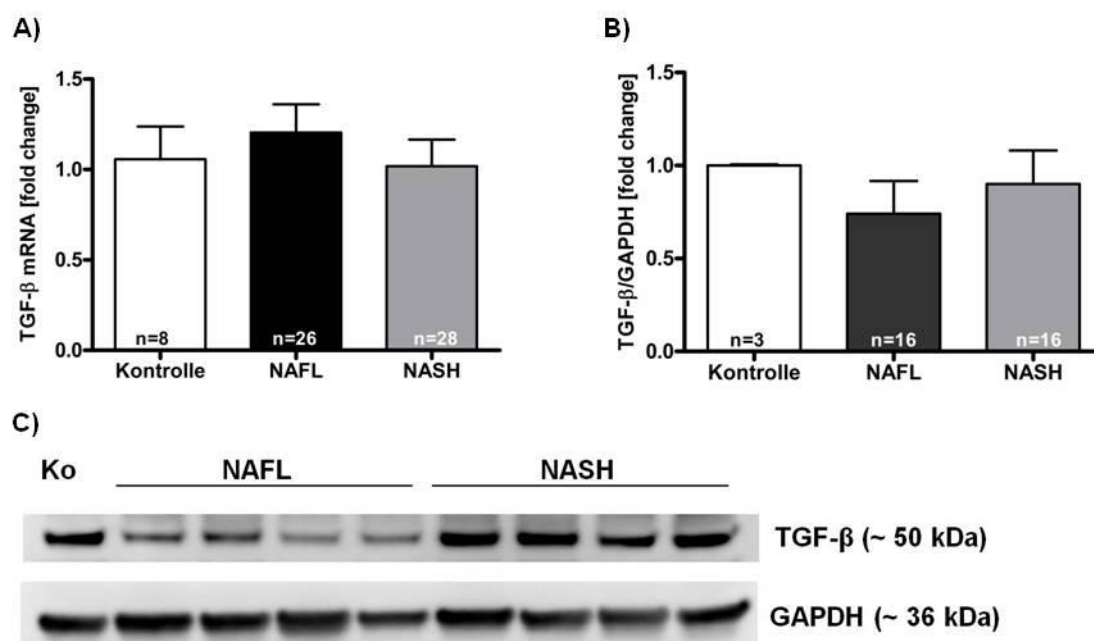
Representative Abbildungen der Kollagen-Deposition (mittels Sirius Red) und  $\alpha$ -SMA-Expression (mittels Immunhistochemie) im Lebergewebe von Kontrollen, NAFL- und NASH-Patienten. Das zytoskelettale Protein  $\alpha$ -SMA wurde mittels  $\alpha$ -SMA-FITC-Antikörper (grün) und die Zellkerne mittels DAPI (blau) gefärbt. Zusätzlich wurde für jede Gruppe eine Übersichtsfärbung mittels HE durchgeführt. Hierbei konnte in NASH-Patienten ein Anstieg von  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  gezeigt werden.

Eine gesteigerte Expression und Deposition extrazellulärer Matrixkomponenten am Beispiel des fibrillären Proteins Kollagen (als charakteristisches Kennzeichen einer Fibroseprogression und der damit fortgeschrittenen NAFLD) wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der Gen- und Proteinexpression des Col1 $\alpha$  überprüft. In der untersuchten NAFLD-Kohorte wurde keine gesteigerte Genexpression von Col1 $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle gefunden (Abbildung 11 C). Interessanterweise wurde bei der Analyse der Proteinexpression durch posttranskriptionale Regulationsmechanismen (z.B. mRNA-Stabilisierung) (Rashid *et al.*, 2012) in den NAFLD-Patienten im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg von Col1 $\alpha$  (Ko vs. NAFL:  $p = 0,0014$ ; Ko vs. NASH:  $p = 0,0076$ ) beobachtet (Abbildung 11 D, E). Zwischen der NAFL- und NASH-Gruppe stieg die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression nur marginal an

(Abbildung 11 D, E). Histologisch konnte anhand der Anfärbung der Kollagenfasern mittels Sirius Red-Färbung die gesteigerte Kollagensynthese, die zelluläre Verteilung der Kollagen-Deposition und die mit der Fibrosierung einhergehende hepatische Strukturveränderung dargestellt werden (Abbildung 12). Sowohl die Western-Blot Analysen als auch der histologische Nachweis zeigten, dass im Vergleich zur Kontrolle in NAFLD-Patienten eine verstärkte Kollagen-Deposition in periportalen Bereichen erfolgte, wobei zusätzlich eine Korrelation zwischen der Col1 $\alpha$ -Expression und dem Schweregrad einer NAFLD beobachtet wurde (Abbildung 11 D, Abbildung 12).

### 3.1.4 Untersuchung der TGF- $\beta$ -Expression in NAFLD-Patienten

Die Untersuchung der TGF- $\beta$ -Expression wurde einerseits aufgrund des erwähnten Anstieges durch verstärkter Apoptose (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008) und andererseits durch den nachgewiesenen Anstieg der TGF- $\beta$ -mRNA in NASH-Ratten (Tsukada *et al.*, 2006) durchgeführt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die gesteigerte Kollagen-Deposition auch auf eine veränderte TGF- $\beta$ -Expression in dieser Kohorte zurück geführt werden kann (Das *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a; Tsukada *et al.*, 2006).



**Abbildung 13: TGF- $\beta$ -Expression in NAFLD-Patienten und Kontrollen.**

Abgebildet sind die relative hepatische mRNA-Expression von TGF- $\beta$  (A) sowie die relativen Proteinexpressionen von TGF- $\beta$  latent (B) der densitometrischen Auswertung der Western-Blots (normalisiert auf GAPDH). Diese sind angegeben als MW  $\pm$  SEM. C) zeigt repräsentative Western-Blots der hepatischen TGF- $\beta$ -Expression. Signifikanzen des ungepaarten Student's *t*-Tests und die Anzahl der Patienten sind den Abbildungen A-B zu entnehmen. NAFLD-Patienten wiesen keine Korrelation zwischen TGF- $\beta$  und dem Schweregrad der NAFLD auf.

Entgegen der in NASH-Ratten detektierten erhöhten TGF- $\beta$ -mRNA-Expression zeigte die Analyse der NAFLD-Kohorte keinen Unterschied in der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 13 A). Hinsichtlich der TGF- $\beta$ -Proteinexpression wies die NAFL-Gruppe sogar eine tendenzielle Verminderung der endogenen TGF- $\beta$ -Synthese im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 13 B, C).

Trotz histologischen Nachweises einer vorliegenden Fibrose in NAFLD-Patienten und ihrer Subklassifizierung anhand der Apoptose (M30 ELISA) wurde kein Anstieg des potentesten profibrotischen Stimulus' TGF- $\beta$  detektiert. Auch konnten diese Untersuchungen die vermehrte Kollagen-Expression nicht durch eine gesteigerte TGF- $\beta$ -Expression erklären.

### **3.2 *In vitro*-Experimente an isolierten primären hepatischen Sternzellen**

Die Ergebnisse des Teilprojekt zu NAFLD-Patienten, nach denen bei diesen eine sehr deutliche Zunahme von Kollagen im Lebergewebe erfolgte, führte zur Frage danach, ob die verminderte VD-Serumkonzentration einen Einfluss auf die Aktivierung der HSC hat. Daher wurde in den *in vitro*-Experimenten das Augenmerk auf HSCs gelegt, da sie a) mit ihrer Aktivierung und Transdifferenzierung in Myofibroblasten eine entscheidende Rolle in leberfibrotischen Erkrankungen spielen und b) als Hauptproduzenten der ECM-Produktion angesehen werden (Boyer *et al.*, 2012; Hernandez-Gea *et al.* 2011; Friedman *et al.* 2008b).

Aufgrund der exzessiven Akkumulation von Fetten in Hepatozyten bei einer NAFLD (Hafeez *et al.* 2013; Sydor *et al.*, 2013) sollte sowohl die Wirkung von freien Fettsäuren als auch der Effekt von Vitamin D<sub>2</sub> in FFA vorstimulierten pHSC untersucht werden. Diese Analyse der Expression Fibrose-relevanter Marker wie TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  erfolgte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.

Basierend auf Erkenntnissen früherer Studien, die eine Assoziation zwischen VD-Mangel und Adipositas nachweisen konnten (Cheng *et al.*, 2010), wurde in dieser Arbeit für die *in vitro*-Experimente das biologisch inaktive VD<sub>2</sub> verwendet. Dem physiologischen Stoffwechsel nachempfunden, gelangt das pflanzliche Vitamin D ausschließlich über den enterohepatischen Kreislauf in den Körper. Somit konnte die durch experimentelle und humane Studien vermutete, abnorm gesteigerte Speicherung des endogenen Vitamins D in Adipozyten mit der daraus folgenden verminderten Bioverfügbarkeit in adipösen Patienten umgangen werden (Rosenstreich *et al.*, 1971; Wortsman *et al.*, 2000). Aufgrund der interindividuell unterschiedlichen Bioverfügbarkeit



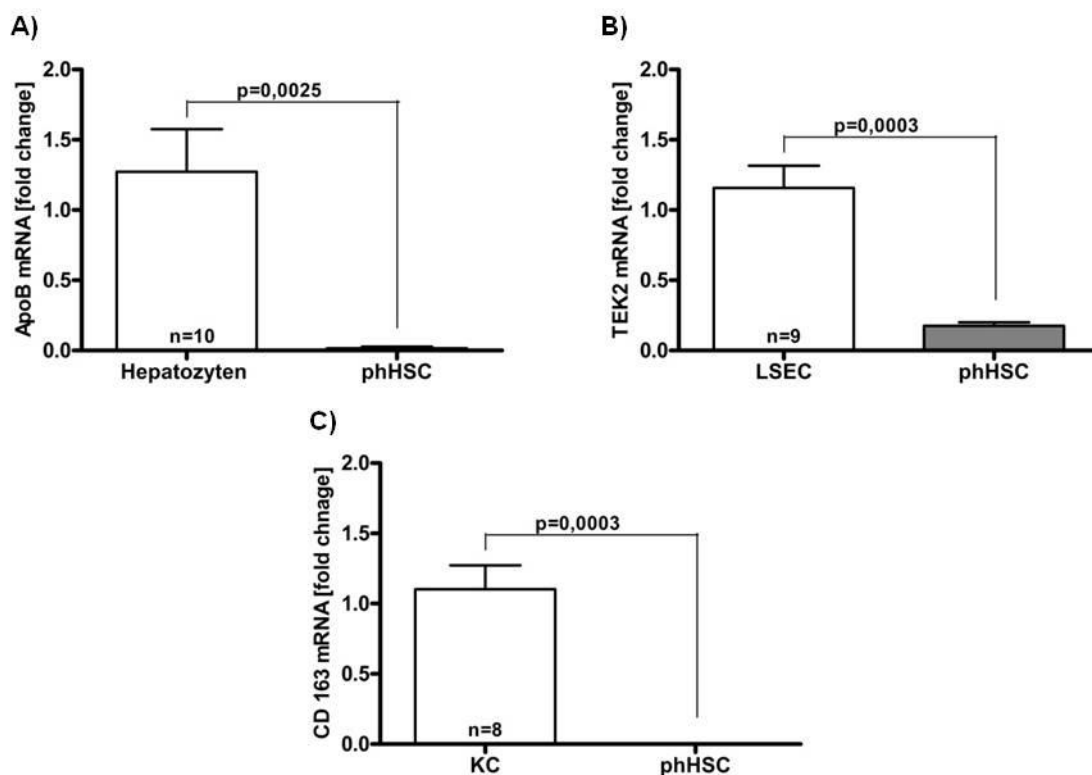
des VDs über den enterohepatischen Weg sowie die geringe Tolerierbarkeit des Organismus' für 1,25-VD wurde die aktive Form hier nicht verwendet.

Vor Durchführung der *in vitro*-Experimente wurden die isolierten pHSCs hinsichtlich ihrer Reinheit und ihrer Aufnahmefähigkeit für VD<sub>2</sub> und FFA verifiziert.

### 3.2.1 Nachweis der Isolation humaner primärer hepatischer Sternzellen

Für die Verifizierung der aus Lebergewebe isolierten pHSC wurde die Gen- und Proteinexpression verschiedener zelltypischer Marker durchgeführt. Zum Ausschluss möglicher Verunreinigungen isolierter pHSC durch andere hepatische Zelltypen (z.B: Hepatozyten, KC, LSEC) dienten folgende zellspezifische Marker: **Hepatozyten:** Apolipoprotein B (ApoB), Albumin; **LSEC:** *tyrosine kinase endothelial 2* (TEK2), CD146; **KC:** CD163; **pHSC:**  $\alpha$ -SMA.

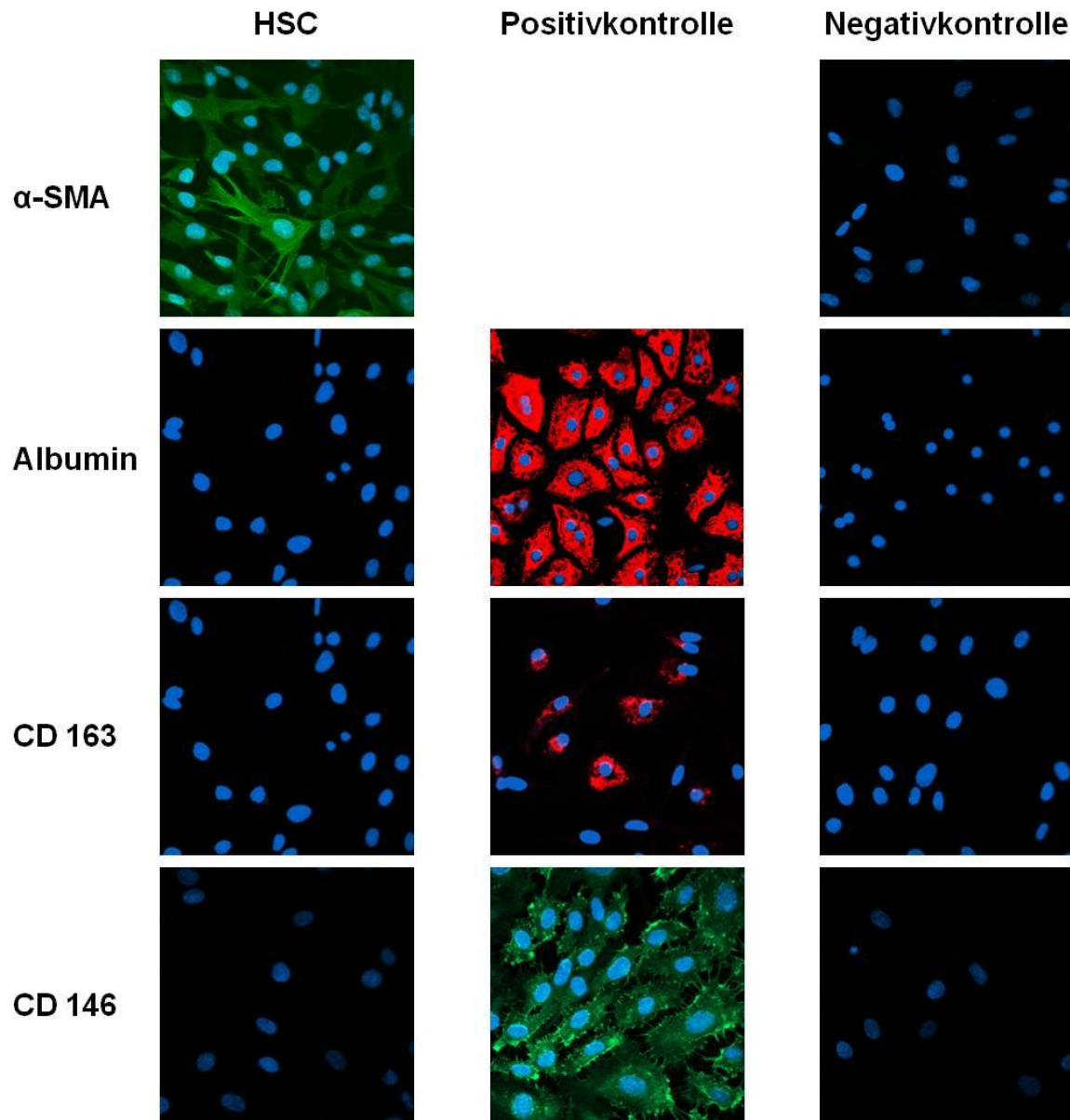
Mittels qRT-PCR waren in den pHSC-Isolaten nur sehr geringe mRNA-Expressionen der Marker für Hepatozyten (ApoB:  $0,017 \pm 0,01$ ; n = 15), KC (CD 163:  $0,003 \pm 0,002$ ; n = 11) und LSEC (TEK2:  $0,17 \pm 0,026$ ; n = 14) (Abbildung 14) nachweisbar.



**Abbildung 14: Verifizierung der pHSC mit zellspezifischen Markern.**

Dargestellt sind relative mRNA-Expressionen isolierter Leberzellen als MW  $\pm$  SEM. Hepatozyten-, LSEC- und KC-Isolate dienen als Vergleichsgruppen zur Analyse möglicher Verunreinigungen der n = 15 pHSC-Isolate. Die Anzahl sowie die ermittelten Signifikanzen (Student's *t*-Test) können den jeweiligen Diagrammen entnommen werden. Hinsichtlich ihrer Genexpression wiesen die pHSC-Isolate nur geringe Verunreinigungen durch andere leberspezifische Zellen auf.

Die in der Genexpression durch andere Leberzellen detektierte geringe Verunreinigung wurde im Anschluss auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz überprüft: Isolierte pHSC zeigten eine deutliche  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression. Zusätzlich zeigten die isolierten Zellen keine Expression Hepatozyten-, KC- und LSEC-spezifischer Marker (Abbildung 15). Die isolierten pHSC waren somit hoch rein.



**Abbildung 15: Nachweis der pHSC-Reinheit mittels Immunzytochemie.**

Zellpopulationsspezifische Proteine wurden mit Hilfe unterschiedlicher Antikörperkonjugate angefärbt und mittels Laser Scanning-Mikroskopie dargestellt. Neben pHSCs wurden Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass pHSCs  $\alpha$ -SMA exprimierten.

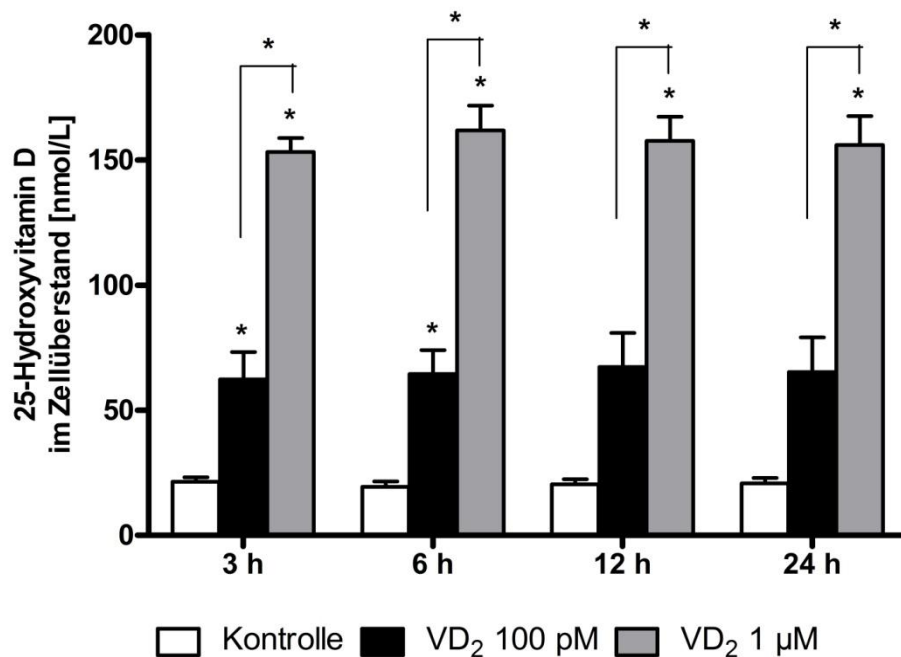
### 3.2.2 Nachweis der Aufnahme und Hydroxylierung von VD<sub>2</sub>

Bevor Untersuchungen hinsichtlich möglicher VD<sub>2</sub>-Wirkungen auf die Expression Fibrose-relevanter Proteine durchgeführt werden konnten, musste die Aufnahme von



VD<sub>2</sub> in pHSC nachgewiesen werden. Die in der Leber vorkommenden Cytochrom P<sub>450</sub>-Isoformen CYP2R1 und CYP27A1 (Kitson *et al.*, 2012; Barchetta *et al.*, 2012) lassen die Fähigkeit der pHSC zur Aufnahme und Metabolisierung des VD<sub>2</sub> vermuten. Durch die Verwendung eines 25-Hydroxyvitamin D-EIAs konnten sowohl die Aufnahme als auch die Hydroxylierung von VD<sub>2</sub> nachgewiesen werden.

Mittels EIA wurde die Aufnahme und Umwandlung des Vitamin D<sub>2</sub> zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub> zeitkinetisch detektiert. Die VD<sub>2</sub>-Hydroxylierung erfolgte ausschließlich in konzentrationsabhängiger Weise (Abbildung 16).

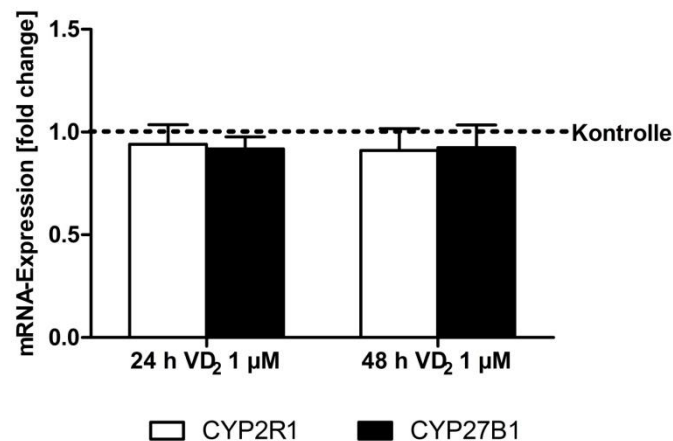


**Abbildung 16: Metabolisierung von VD<sub>2</sub> zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>.**

Graphische Darstellung der 25-VD<sub>2</sub>-Konzentrationen in pHSC Zellüberständen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Das Signifikanzniveau (\*) gegenüber der Kontrolle bzw. innerhalb der Gruppen betrug  $p < 0,05$ . Es konnte eine konzentrationsabhängige Hydroxylierung von VD<sub>2</sub> ermittelt werden.

Zusätzlich durchgeführte Messungen zur Genexpression von CYP2R1 und CYP27B1 dienten sowohl dem Nachweis der Anwesenheit dieser Enzyme in den isolierten pHSC als auch der möglichen Modulation ihrer Expression durch VD<sub>2</sub>. Die in der Leber exprimierte Cytochrom P450-Isoform CYP2R1 (Kitson *et al.*, 2012; Barchetta *et al.*, 2012) wurde speziell in den primären humanen HSC detektiert (Abbildung 17 A). Jedoch hatte die Zugabe von 1  $\mu$ M VD<sub>2</sub> keinen Einfluss auf die Genexpression des CYP2R1 zu den untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 17 A).

Der intensiv regulierte, letzte Aktivierungsschritt des VDs, welcher vorrangig im proximalen Tubuluszellen und in geringen Maße in extrarenalen Gewebe (Lunge, Colon, pankreatische  $\beta$ -Zellen) stattfindet (Kitson *et al.*, 2012; Dusso *et al.*, 2005), benötigt die mitochondriale Cytochrom P<sub>450</sub>-abhängige Monooxygenase CYP27B1. Bisher wurde eine Expression von CYP27B1 in pHSC nicht nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob pHSC die Fähigkeit besitzen biologische aktives VD<sub>2</sub> herstellen zu können, fand die Untersuchung der CYP27B1-mRNA-Expression mittels qRT-PCR nach 24- und 48-stündiger VD<sub>2</sub>-Behandlung statt. Es zeigte sich, dass pHSC die mRNA für CYP27B1 exprimierten, es jedoch nicht zu einer Änderung im Expressionsverhalten durch die Zugabe von VD<sub>2</sub> kam (Abbildung 17). Mit Hilfe diese Untersuchung wurden Aufnahme und Metabolismus des VD<sub>2</sub> in pHSC nachgewiesen.



**Abbildung 17: mRNA-Expression von CYP2R1 und CYP27B1 in pHSCs.**

Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der Cytochrom P450 Isoformen CYP2R1 und CYP27B1 in pHSCs nach 24- und 48-stündiger VD<sub>2</sub>-Behandlung. Gesamtauswertung der qRT-PCR angegeben als MW  $\pm$  SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (Triplikate). Eine VD<sub>2</sub> unbeeinflusste mRNA-Expression der Isoformen konnte nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Behandlung der pHSC mit freien Fettsäuren zur Simulation steatotischer Bedingungen in der Leber

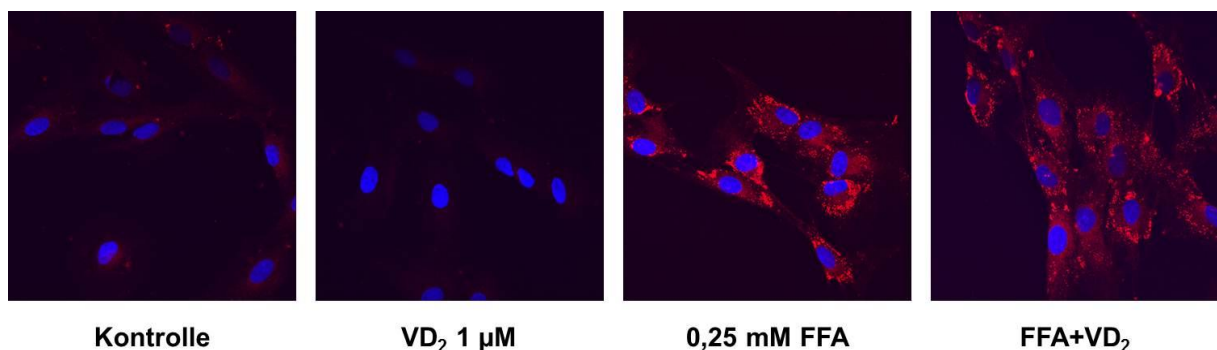
Die als mutmaßlicher Stimulus für die NAFLD-Progression angesehenen freien Fettsäuren, welche Einfluss auf verschiedene metabolische Signalwege haben (Bechmann *et al.*, 2013), könnten auch eine Wirkung auf die VDR-Expression ausüben und somit die Bioverfügbarkeit des VD reduzieren. Zur Überprüfung, ob erhöhte Konzentrationen von FFA die Expression von VDR und/oder Fibrose-relevanten Markern modulieren, wurden pHSC *in vitro* für eine Stunde mit FFA vorinkubiert und anschließend mit bzw. ohne VD<sub>2</sub> für 24 h und 48 h behandelt. Des Weiteren konnte infolge einer pHSC-Vorbehandlung mit FFA zur Simulation

erhöhter Fettkonzentrationen bei NAFLD-Patienten ein Vergleich zwischen den ermittelten *in vitro*- und Patienten-Daten erfolgen.

Zusätzlich zum Nachweis der FFA-Aufnahme in pHSC erfolgte die Analyse molekularer Veränderungen verschiedener profibrogener Marker auf mRNA- und Proteinebene.

### 3.2.3.1 Aufnahme freier Fettsäuren in behandelten pHSC nach 24 Stunden

Die Aufnahme der FFA in pHSC wurde mikroskopisch mittels Nile Red-Färbung dargestellt. Die Behandlung mit FFA führte in den pHSC zu einem interessanten Befund: FFA-Konzentrationen, die bei Hepatozyten standardisiert eingesetzt werden (Sydor *et al.*, 2013), wirkten destruktiv auf pHSC. Durch Vorexperimente konnte ermittelt werden, dass eine Behandlung der Zellen für 1 h mit 0,25 mM FFA und anschließendem Mediumwechsel keine Zellzerstörung hervorrief. Sowohl in der Kontrolle als auch in den mit VD<sub>2</sub> behandelten pHSC wurden keine Fettvakuolen beobachtet (Abbildung 18). Eine einstündige Behandlung der Zellen mit 0,25 mM FFA rief unabhängig von VD<sub>2</sub> nach 24-stündiger Kultivierung eine Ansammlung von Fettvakuolen hervor (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Mikroskopische Darstellung der Aufnahme von FFA in pHSC.**

Dargestellt sind repräsentative Bilder der Aufnahme von FFA in pHSCs. Nach 1-stündiger Inkubation mit FFAs und weiterer 24-stündiger Kultivierung wurde die FFA-Aufnahme mittels Nile Red-Färbung nachgewiesen. Behandlung mit VD<sub>2</sub> bewirkte keine Änderung der FFA-Speicherung.

### 3.2.3.2 Effekte der VD<sub>2</sub>- und FFA-Behandlung auf Fibrose, Inflammation und VDR-Expression in isolierten pHSC

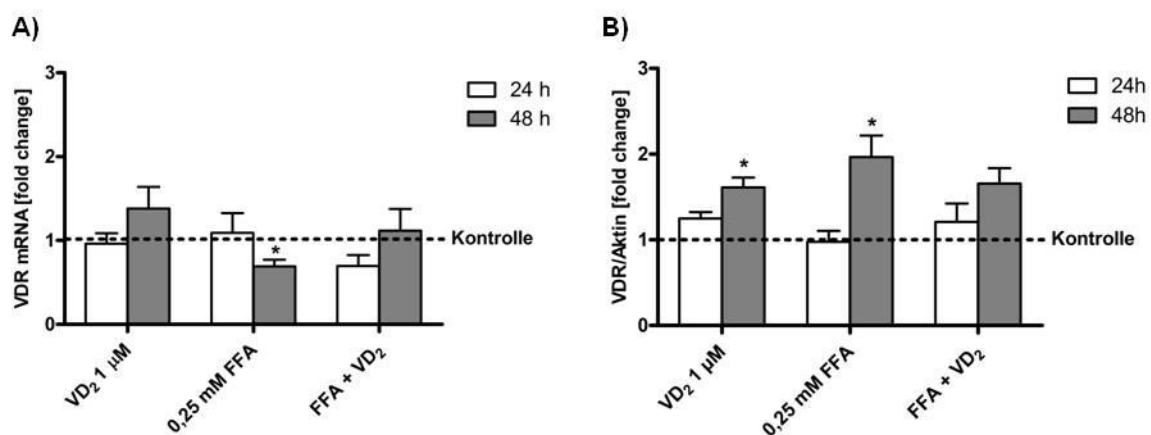
Nachdem eine Aufnahme von VD<sub>2</sub> und FFA in isolierten pHSC gezeigt werden konnte (s. 3.2.2 und 3.2.3.1), wurde anschließend untersucht, ob FFA und/oder VD<sub>2</sub> in pHSC die Fibrose, Inflammation und VDR-Expression beeinflussen. Zur Abklärung der Wirkungen von FFA und VD<sub>2</sub> wurde eine Versuchsaufbau aus Kontrolle, Einzelbehandlungen der Zellen mit FFA (0,25 mM) oder VD<sub>2</sub> (1 µM) sowie eine kombinierte Behandlung aus einstündiger Vorstimulation der pHSC mit FFA und anschließender Inkubation mit VD<sub>2</sub> benötigt. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation der Zellen erfolgte

die Analyse der Gen- und Proteinexpression des VDR sowie der profibrotischen und proinflammatorischen Marker.

### 3.2.3.2.1 VDR-Expression in isolierten pHSC nach 24- und 48-stündiger Behandlung mit FFA und VD<sub>2</sub>

Auf Grundlage des nachgewiesenen Vitamin D-Mangels und der veränderten VDR-Expression in der verwendeten NASH-Kohorte sollten in diesem Teilabschnitt die Auswirkung von VD<sub>2</sub> und/oder FFA auf das VDR-Expressionsverhalten bestimmt werden.

Hinsichtlich der VDR-Genexpression bewirkten Behandlungen der pHSC mit FFA oder VD<sub>2</sub> keine Änderungen im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h (Abbildung 19 A). Demgegenüber verursachte eine kombinierte Behandlung aus FFA und VD<sub>2</sub> eine signifikante Reduktion (Ko vs. FFA + VD<sub>2</sub>:  $p = 0,021$ ) der VDR-mRNA-Expression (Abbildung 19 A). Nach 48-stündiger Inkubation erzielte lediglich die Gabe von FFA eine signifikant reduzierte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Ko vs. FFA:  $p = 0,0127$ ), welche durch eine zusätzliche Gabe von VD<sub>2</sub> aufgehoben wurde (Abbildung 19 A). Nach 48-stündiger Inkubation der pHSC mit VD<sub>2</sub> konnte eine marginale Steigerung der Genexpression verzeichnet werden (Abbildung 19 A).



**Abbildung 19: VDR-Expression in FFA- und VD<sub>2</sub>-behandelten pHSC nach 24 und 48 h.**

Graphisch dargestellt sind die relativen VDR-Expressionen der mRNA (A) und des Proteins (B) in FFA (0,25 mM) und/oder VD<sub>2</sub> (1 µM) behandelten pHSC nach 24 h und 48 h, welche als MW ± SEM angegeben wurden. Die mRNA-Daten wurden aus  $n = 8$  unabhängigen Experimenten (Triplikate) ermittelt. Die Auswertung der Proteinexpressionen erfolgte densitometrisch und auf  $\beta$ -Aktin normalisiert aus  $n = 4$  unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ; mittels Student's  $t$ -Test) können den Diagrammen entnommen werden. FFA bewirkten eine Reduktion der VDR-mRNA-Expression nach 48 h. Beide Behandlungen verursachten eine Induktion der VDR-Proteinexpression nach 48 h.

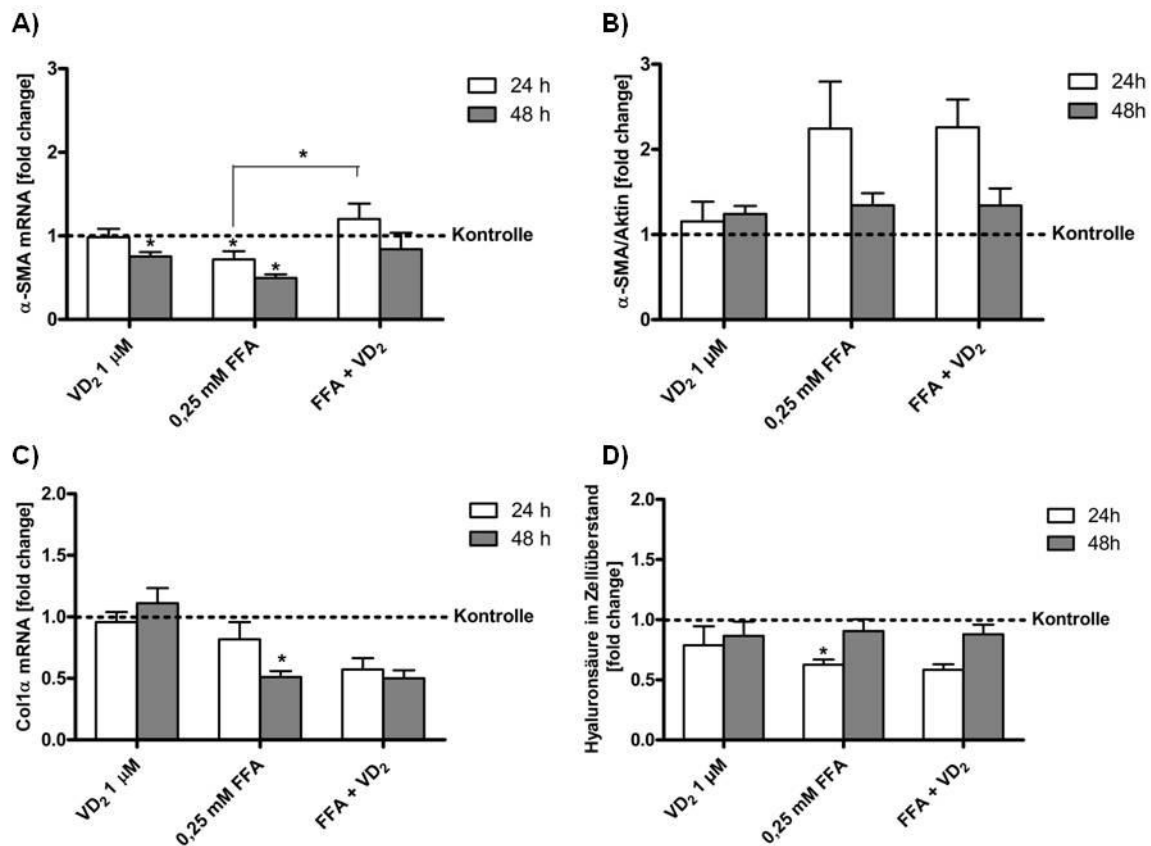
Bei der Betrachtung der VDR-Proteinexpression zeigte sich im Vergleich zur mRNA-Expression bei VD<sub>2</sub> bzw. FFA inkubierten pHSC nach 24 h ein identisches Bild (Abbildung 19 B). Jedoch konnte die nach 24 h beobachtbare Reduktion der Genexpression in FFA und VD<sub>2</sub> behandelten Zellen auf Proteinebene nicht bestätigt werden (Abbildung 19 B). Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte nach 48 h jegliche Behandlung der Zellen eine signifikante Erhöhung der VDR-Proteinmenge (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0025$ ; Ko vs. FFA:  $p = 0,032$ ; Ko vs. FFA+VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0371$ ) (Abbildung 19 B). Zusätzlich wurde in den Gruppen der Einzelbehandlungen ein zeitlich signifikanter Unterschied (VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0387$ ; FFA:  $p = 0,0127$ ) verzeichnet (Abbildung 19 B). Bei dieser *in vitro*-Untersuchung zeigten pHSC nach FFA-Gabe im Vergleich mit den Daten der *ex vivo*-Untersuchungen innerhalb der NASH-Gruppe widersprüchliche Befunde: Während *ex vivo* die hepatische VDR-Genexpression tendenziell anstieg (siehe 3.1.2) und die Proteinexpression des Gesamtlängens VDRs signifikant reduziert war (siehe 3.1.2), zeigte sich ein entgegengesetztes Verhalten in den pHSC. Dies zeigt, dass FFA in jedem Fall einen Einfluss auf die gemessenen Parameter haben, *in vivo* aber vermutlich noch weitere (ggf. unbekannte) Kofaktoren zum Tragen kommen.

### **3.2.3.2.2 Expression von Strukturproteinen in pHSC nach Behandlung mit FFA und VD<sub>2</sub>**

Die in früheren Studien beschriebene, abnorm gesteigerte Produktion der extrazellulären Matrix (Wells *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2008a; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; siehe auch 3.1.3) induzierte die Untersuchung der Expressionsänderung von Col1 $\alpha$  als einer der Hauptkomponenten der ECM (Madson *et al.*, 2012; Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2011) an FFA- und VD<sub>2</sub>-behandelten pHSCs. Des Weiteren erfolgte die Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression, da dieses mit dem Aktivierungszustand der HSC korreliert und diese wiederum als Hauptproduzenten der Kollagen-Deposition angesehen werden (Friedman *et al.*, 2008a).

Die Behandlungen der pHSC mit VD<sub>2</sub> und/oder FFA für 24 h und 48 h verursachten keine Aktivierung der Genexpression von  $\alpha$ -SMA im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 A). Es ließ sich sogar durch die Behandlungen mit FFA zu beiden untersuchten Zeitpunkten (24 h:  $p = 0,0042$ ; 48 h:  $p < 0,0001$ ) und mit VD<sub>2</sub> nach 48 h ( $p = 0,0047$ ) eine signifikante Reduktion der Genexpression in den pHSC erzielen (Abbildung 20 A). Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h verursachte die Gabe von VD<sub>2</sub> zu FFA vorstimulierten pHSC gegenüber der Einzelbehandlung mit FFA einen

Anstieg der  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression in unterschiedlichem Ausmaß (24 h:  $p = 0,0325$ ), welche aber nicht die Expression der Kontrolle überstieg (Abbildung 20 A).



**Abbildung 20: Expressionsänderung der Strukturproteine in pHSC nach 24 und 48 h Behandlung.**

Graphisch dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen von  $\alpha$ -SMA (A) und Col1 $\alpha$  (C) sowie die relative Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA (B) in FFA (0,25 mM) und/oder VD<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) behandelten pHSC nach 24 h und 48 h, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben wurden. Die Messung der Hyaluronsäure in pHSC-Überständen mittels ELISA (D) aus  $n = 6$  unabhängigen Experimenten (Duplikate) spiegelt indirekt die Col1 $\alpha$ -Proteinmenge wieder. Die mRNA-Daten wurden aus  $n = 8$  unabhängigen Experimenten (Triplikate) ermittelt. Die Auswertung der Proteinexpressionen erfolgte densitometrisch und auf  $\beta$ -Aktin normalisiert aus  $n = 4$  unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) gemäß Student's  $t$ -Test können den Diagrammen entnommen werden. Während FFA inhibitorisch auf die Genexpression wirkten, wurde auf Proteinebene die Expression von  $\alpha$ -SMA induziert und von Col1 $\alpha$  reduziert. VD<sub>2</sub> erzielte keine Wirkung.

Die FFA-abhängig reduzierte Genexpression von  $\alpha$ -SMA konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Hier wurde nach 24 h sogar eine tendenzielle Erhöhung durch FFA-Gabe beobachtet, welche sich nach 48 h dem Kontrollniveau annäherte (Abbildung 20 B). Die durch FFA verursachte Induktion der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression konnte durch die Gabe von VD<sub>2</sub> nicht antagonisiert werden (Abbildung 20 B). Des

Weiteren zeigte auch eine alleinige Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> keine Expressionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 B).

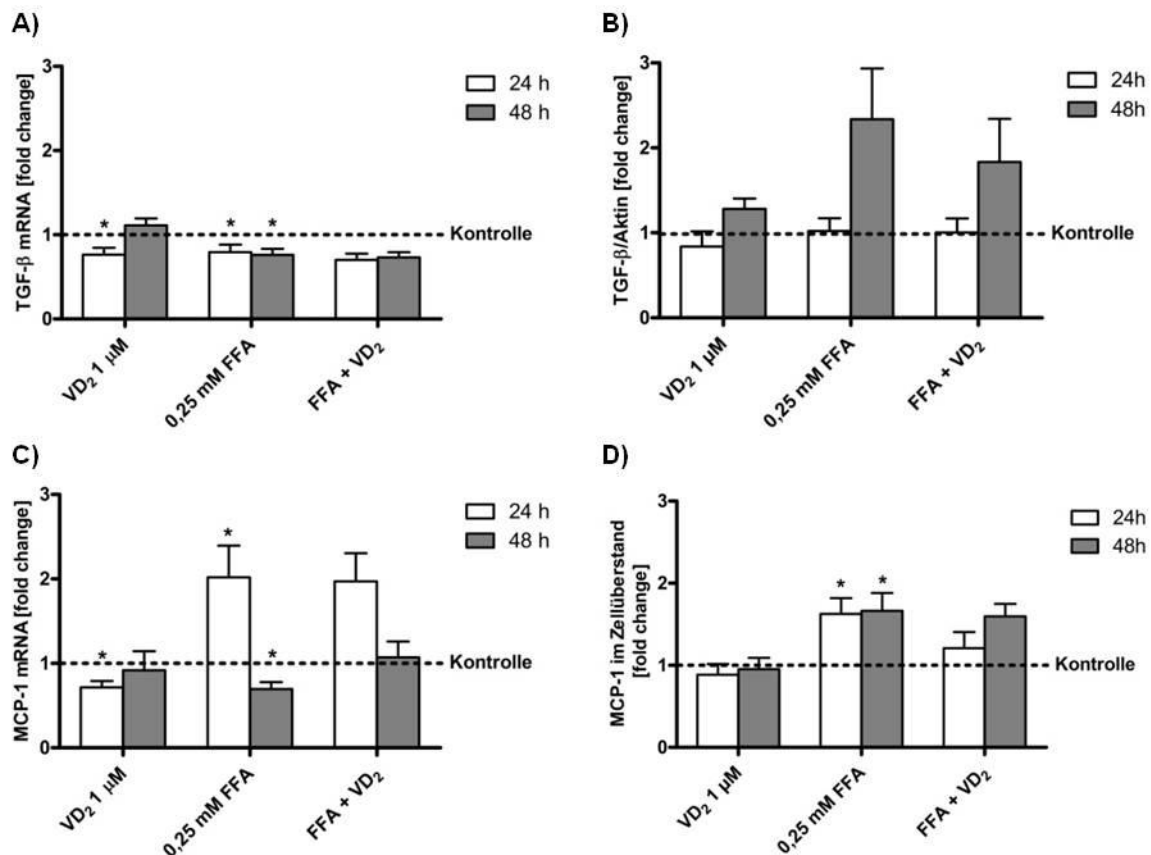
Im Gegensatz zum  $\alpha$ -SMA beeinflusste die alleinige Gabe von VD<sub>2</sub> die Genexpression des fibrillären Kollagens (Col1 $\alpha$ ) zu keinem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 C). Hingegen wurden signifikante Reduktionen der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle sowohl unter alleiniger Gabe von FFA nach 48 h ( $p < 0,0001$ ) als auch unter kombinierter Gabe aus FFA und VD<sub>2</sub> zu beiden Zeitpunkten (24 h:  $p = 0,0009$ ; 48 h:  $p < 0,0001$ ) beobachtet (Abbildung 20 C). Es wurden keine Unterschiede in der Expression des Col1 $\alpha$  zwischen FFA und mit FFA und VD<sub>2</sub> behandelten pHSC festgestellt (Abbildung 20 C).

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression von Kollagen anhand des indirekten Markers Hyaluronsäure im Überstand der pHSC detektiert. Wie schon in der Genexpressionsuntersuchung nachgewiesen, bewirkte in pHSC die Gabe von VD<sub>2</sub> keinen Unterschied in der Proteinexpression des Col1 $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 D). Im Gegensatz dazu erzielte die Gabe von FFA nach 24 h eine signifikante Reduktion der Hyaluronsäurekonzentration, welche durch eine zusätzliche Gabe von VD<sub>2</sub> nicht verändert wurde (Abbildung 20 D). Diese nach 24 h hervorgerufene, verminderte Proteinexpression konnte jedoch nach 48 h nicht aufrechterhalten werden (Abbildung 20 D).

Verglichen mit den *ex vivo*-Daten der NAFLD-Kohorte wurden in der *in vitro*-Analyse die reduzierte Genexpression und die nahezu unveränderte Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA durch Behandlung der Zellen mit FFA bestätigt. Somit scheint dieses Zellkulturmodell bezüglich dieses Parameters gut geeignet zu sein. Im Gegensatz dazu wurde der im Patientenkollektiv gezeigte Kollagenanstieg durch FFA in diesem Zellkulturmodell nicht wiedergefunden.

#### **3.2.3.2.3 Zytokinexpression in isolierten pHSC nach Behandlung mit VD<sub>2</sub> und FFA**

Aktivierte hepatische Sternzellen fördern nicht nur durch die Produktion von Kollagen den Progress der Fibrose, sondern begünstigen durch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  und MCP-1 das Fortschreiten der Fibrose. Zusätzlich konnte schon in der NAFLD-Patientenkohorte nachgewiesen werden, dass eine progrediente NAFLD mit tendenziell gesteigerter MCP-1-Expression einherging.



**Abbildung 21: Expressionsänderungen der Zytokine TGF-β und MCP-1 in FFA- und VD<sub>2</sub>-behandelten pHSC nach 24 h und 48 h.**

Graphisch dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen von TGF-β (A) und MCP-1 (C) sowie die relative Proteinexpression von TGF-β (B) in FFA (0,25 mM) und/oder VD<sub>2</sub> (1 μM) behandelten pHSC nach 24 h und 48 h, welche als MW ± SEM angegeben wurden. Die Messung der MCP-1 Proteinexpression erfolgte in pHSC-Überständen mittels ELISA (D) aus n = 7 unabhängigen Experimenten (Duplikate), welche als MW ± SEM angegeben sind. Die mRNA-Daten wurden aus n = 8 unabhängigen Experimenten (Triplikate) ermittelt. Die Auswertung der Proteinexpressionen erfolgte densitometrisch und auf β-Aktin normalisiert aus n = 4 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) berechnet mittels Student's *t*-Test können den Diagrammen entnommen werden. Primäre pHSC wiesen durch FFA eine induzierte Zytokinproteinexpression auf. VD<sub>2</sub> inhibiert ausschließlich in unstimulierten pHSC die Zytokin-mRNA-Expression.

Die Untersuchung des potentesten Stimulus der Fibrose, des TGF-β, zeigte in der Genexpression, dass weder VD<sub>2</sub> noch FFA stimulierend auf die TGF-β-mRNA-Expression wirkten. Alle Behandlungen führten nach 24 h Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Menge (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0018$ ; Ko vs. FFA:  $p = 0,0057$ ; Ko vs. FFA+VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0001$ ) (Abbildung 21 A). Diese signifikanten Verringerungen der Genexpression konnten mit Ausnahme der VD<sub>2</sub>-Behandlung weiterhin auch nach 48 h beobachtet werden (Ko vs. FFA:  $p = 0,0104$ ; Ko vs. FFA+VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0033$ ) (Abbildung 21 A). Zusätzlich kann Abbildung 21 A entnommen werden, dass die



inhibierende Wirkung einer alleinigen Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> auf die TGF- $\beta$ -Genexpression durch kombinierte Behandlung nicht weiter gesteigert wird.

Die in der TGF- $\beta$ -Genexpression durch eine 24-stündige Inkubation mit VD<sub>2</sub> und/oder FFA erzielte Reduktion konnte auf Proteinebene nicht aufrechterhalten werden. Gegenüber der Kontrolle bewirkte keine der Behandlungen nach 24 h Expressionsunterschiede (Abbildung 21 B). Des Weiteren bewirkte gegenüber der Kontrolle eine Behandlung mit FFA nach 48 h eine tendenziell verstärkte TGF- $\beta$ -Proteinexpression (Ko vs. FFA:  $p = 0,09$ ), welche nicht durch eine Gabe von VD<sub>2</sub> abgemildert werden konnte (Abbildung 21 B).

Das von aktivierten pHSC sezernierte MCP-1, welches durch seine inflammatorische Wirkung am Progress der NAFLD beteiligt ist, wurde durch die Behandlung mit VD<sub>2</sub> lediglich nach 24-stündiger Inkubation in seiner Genexpression signifikant vermindert (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0115$ ) (Abbildung 21 C). Isolierte pHSC reagierten auf eine Behandlung mit FFA nach 24 h mit einer signifikant erhöhten MCP-1-mRNA-Expression (Ko vs. FFA:  $p = 0,0196$ ) und nach 48 h mit einer signifikant verminderten Genexpression (Ko vs. FFA:  $p = 0,0097$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21 C). Jedoch konnte die nach 24 h Inkubation erfolgte inhibitorische Wirkung von VD<sub>2</sub> in FFA vorstimulierten pHSC nicht beobachtet werden. Somit blieb die MCP-1-mRNA-Expression nach 24 h gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Ko vs. FFA+VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0128$ ) (Abbildung 21 C).

In der Untersuchung der Proteinexpression war VD<sub>2</sub> zu keinem Zeitpunkt in der Lage, die Expression von MCP-1 im Vergleich zur Kontrolle zu verändern (Abbildung 21 D). Wie auch schon die Analyse der Genexpression gezeigt hatte, erfolgte eine gesteigerte Synthese des MCP-1-Proteins durch Behandlung der Zellen mit FFA nach 24 h (Ko vs. FFA:  $p = 0,0189$ ) (Abbildung 21 D). Jedoch konnte nach 48 h die durch FFA-Behandlung hervorgerufene reduzierte Genexpression auf Proteinebene nicht beobachtet werden. Hier wurde weiterhin eine signifikant gesteigerte Synthese verzeichnet (Ko vs. FFA:  $p = 0,0386$ ) (Abbildung 21 D). Erstaunlicherweise wurde nach 24-stündiger Inkubation (verglichen mit FFA-behandelten pHSC) in FFA-vorstimulierten pHSC durch VD<sub>2</sub> eine abgemilderte Synthese des Proteins MCP-1 erzielt.

Zusammenfassend lassen die gewonnenen *in vitro*-Daten vermuten, dass FFA- und VD<sub>2</sub>-Supplementation keine Begünstigung der Fibrose verursachen. In den pHSC wurde in der Genexpression durch VD<sub>2</sub> und/oder FFA eher eine Verringerung der

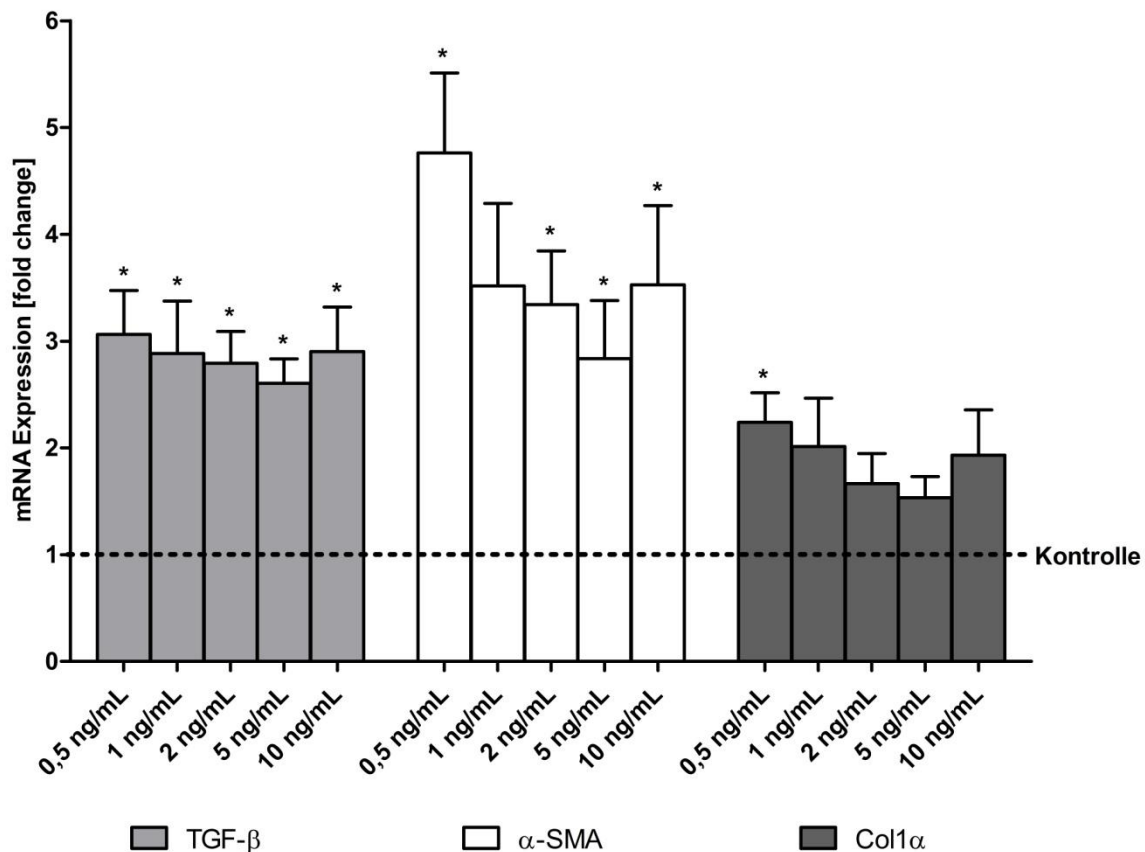
untersuchten Fibrose-relevanten Marker beobachtet. Zwar rief eine FFA-Stimulation der pHSC mit FFA auf Proteinebene eine leichte Induktion von  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  und MCP-1 über die Zeit hervor, doch der in den NAFLD-Patienten ermittelte Kollagenexpressionsanstieg *in vitro* konnte nicht auf eine direkte Stimulation der HSC mit FFA zurückgeführt werden.

### **3.2.4 Behandlungen isolierter pHSC mit TGF- $\beta$ zur Simulation fibrotischer Bedingungen in der Leber**

Ein Zusammenhang zwischen gesteigerter FFA-Serumkonzentration und vermehrter Col1 $\alpha$ -Expression im Lebergewebe von NAFLD-Patienten konnte *in vitro* nicht auf eine Aktivierung und Transdifferenzierung der pHSC durch eine direkte FFA-Behandlung zurückgeführt werden. Verschiedene Studien demonstrierten einen indirekten Zusammenhang zwischen FFA und HSC-Aktivierung. Gesättigte Fettsäuren wurden darin als Schlüsselmediatoren der Lipotoxizität mit resultierender Hepatozytenapoptose bestätigt (Alkhoury *et al.*, 2011; Tsukada *et al.*, 2006). Diese von HSC phagozytierten apoptotischen Hepatozyten trugen durch die Stimulation der ruhenden HSC mit darauffolgender Aktivierung und Transdifferenzierung am Progress der Leberfibrose bei (Alkhoury *et al.*, 2011; Canbay *et al.*, 2003b). Aufgrund der Tatsache, dass Hepatozyten und pHSC unterschiedliche Lebensdauern in Zellkulturen aufwiesen, konnten in dieser Arbeit keine apoptotischen Hepatozyten als Stimulus der HSC-Aktivierung verwendet werden. Der Einsatz von TGF- $\beta$  als Schlüsselmediator der Fibrose (Friedman *et al.*, 2008a; Wells *et al.*, 2006, Jiao *et al.*, 2009), welcher hauptsächlich über den TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg sowohl die Fibrose als auch die Entzündung induziert (Tang *et al.*, 2012; Ding, *et al.*, 2013), ermöglichte die genauere Beurteilung der VD- und VDR-Wirkungen in pHSC.

#### **3.2.4.1 Auswirkungen der TGF- $\beta$ -Stimulation auf die mRNA-Expression Fibrose relevanter Marker in pHSC**

Die Analyse der VD<sub>2</sub>- und VDR-Wirkung in isolierten pHSCs, welche mittels TGF- $\beta$  vorstimuliert werden sollten, setzte die vorherige Ermittlung der Abhängigkeit dieser Wirkungen von der TGF- $\beta$ -Konzentration voraus. Daraufhin wurde die Auswirkung der Stimulation auf die Fibrose innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0,5-10 ng/mL TGF- $\beta$  ermittelt. Hierfür dienten die fibrotischen Marker Col1 $\alpha$  (als Vertreter des fibrillären Kollagens) und  $\alpha$ -SMA (als Transdifferenzierungsmarker für TGF- $\beta$  in aktivierten HSC) (Dooley *et al.*, 2012) und das HSC-aktivierende Zytokin TGF- $\beta$  (Wells *et al.*, 2006; Tsukada *et al.*, 2006) als Parameter.



**Abbildung 22: TGF-β-Konzentrationswirkungskurven in khHSC.**

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expressionen von TGF-β, α-SMA und Col1α nach 24-stündiger Inkubation mit TGF-β (0,5 - 10 ng/mL), welche als MW ± SEM angegeben wurden. Die mRNA-Daten wurden aus n = 4 unabhängigen Experimenten ermittelt. Das Signifikanzniveau (\*) betrug gegenüber der Kontrolle p < 0,05. Exogenes TGF-β induzierte die Genexpression von TGF-β, α-SMA und Col1α.

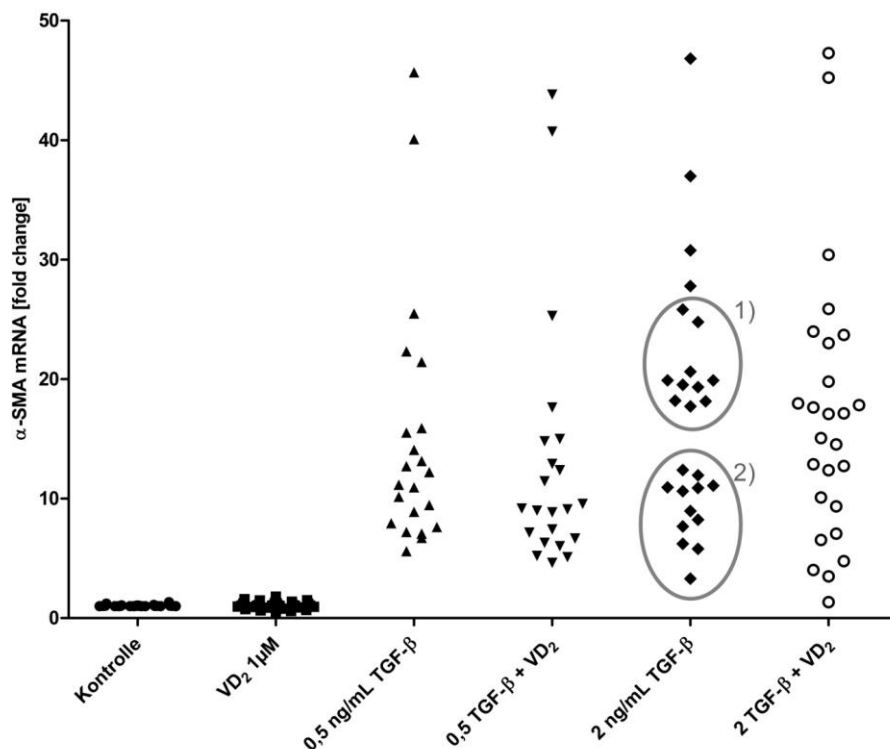
Für die Erstellung der TGF-β-Konzentrationswirkungskurven wurden aufgrund der begrenzten Menge an isolierten pHSC khHSC verwendet. Die Überprüfung der HSC-Stimulation mittels TGF-β erfolgte über einen Zeitraum von 24 h.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, erzielten alle Konzentrationen des verwendeten exogenen TGF-β gegenüber der Kontrolle eine Steigerung der Genexpression von TGF-β, α-SMA und Col1α in unterschiedlichem Maße. Ein signifikanter Konzentrationswirkungsbezug konnte statistisch widerlegt werden.

Auf dieser Basis wurde für nachfolgende *in vitro*-Experimente eine exogene TGF-β Konzentration von 0,5 ng/mL festgelegt. Die zusätzlich erfolgte Analyse mit einer TGF-β-Konzentration von 2 ng/mL diente der Überprüfung, in wieweit VD<sub>2</sub> und VDR eine Wirkung auch bei stärkerer profibrotischer Stimulation in HSC erzielen konnten.

### 3.2.4.2 Vitamin D-Wirkungen in TGF- $\beta$ vorstimulierten pHSC

In dieser Experimentenreihe wurde der Einfluss von VD<sub>2</sub> auf pHSC mit und ohne einstündiger exogener TGF- $\beta$ -Vorstimulation (0,5 und 2 ng/mL) nach 24 und 48 h hinsichtlich des Expressionsverhaltens Fibrose-relevanter Marker untersucht. Molekulare Veränderungen infolge der pHSC-Behandlungen wurden auf Genexpressions-ebene mittels qRT-PCR und hinsichtlich der Proteine mittels Western-Blot detektiert.



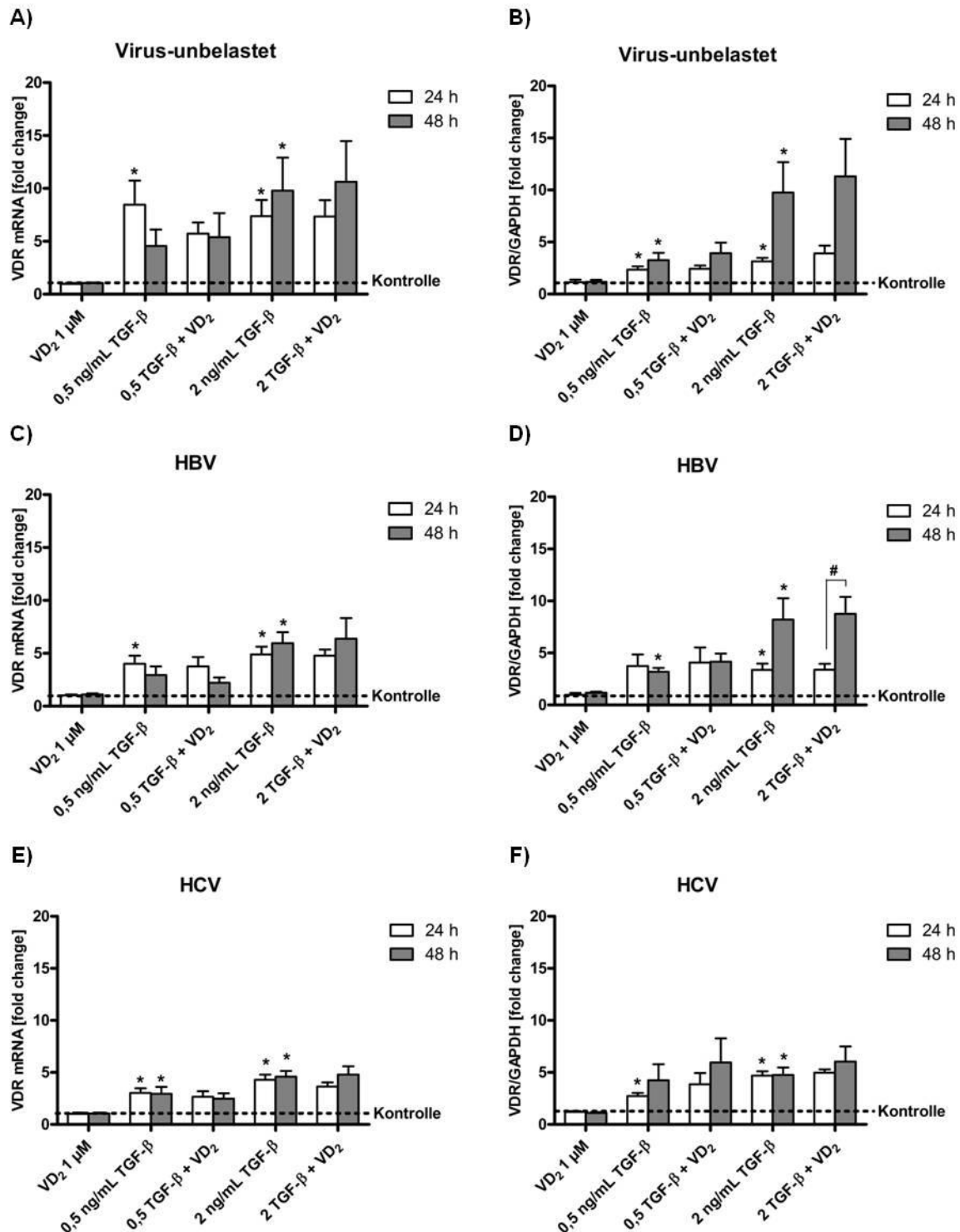
**Abbildung 23: Virus-abhängige Streuungen der  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression in pHSCs bei der Behandlung mit VD<sub>2</sub> und/oder TGF- $\beta$  nach 24 h.** Graphische Darstellung der relativen  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression von insgesamt 30 verschiedenen pHSC-Isolaten nach 24 h Behandlung mit TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub>. Besonders bei einer Stimulation der Zellen mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  zeigte sich eine Virus-abhängige Expression von  $\alpha$ -SMA: 1) vorwiegend Virus-unbelastete und 2) vorwiegend HCV-belastete phhSC.

Bei der Auswertung aller gewonnenen Daten konnte eine Streubreite in den untersuchten mRNA-Expressionen zwischen den einzelnen Experimenten beobachtet werden. Bei der systematischen Analyse möglicher Einflussfaktoren - wie Medikamenteneinnahme, Primärerkrankung - fiel insbesondere bei pHSC, die mit 2 ng/mL exogenem TGF- $\beta$  stimuliert waren, eine Virus-Abhängigkeit (z.B. bei der  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression ersichtlich in Abbildung 23) auf. Aufgrund dessen wurden die isolierten pHSC in die Untergruppen „Virus-unbelastet“, „Hepatitis B Virus (HBV)“ und „HCV“ separiert.

### 3.2.4.2.1 Auswirkungen von TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> auf die VDR-Expression in pHSC

Neben der Überprüfung der VD<sub>2</sub>-Wirkung auf Fibrose und Entzündung wurde auch der Einfluss von VD<sub>2</sub> auf das Expressionsverhalten des VDRs kontrolliert. Unabhängig von der Viruslast führte die Behandlung der pHSC ohne exogene TGF- $\beta$ -Vorstimulation mit VD<sub>2</sub> im untersuchten Zeitraum zu keiner Änderung der mRNA-Expression (Abbildung 24). Die von Abramovitch *et al.* (2011) in isolierten Ratten-HSC gezeigte, unbeeinflusste VDR-Expression nach 24-stündiger TGF- $\beta$ -Gabe konnte hier in isolierten pHSC nicht untermauert werden. Die Stimulation der pHSC mit exogenem TGF- $\beta$  rief Virus-unabhängig eine gesteigerte VDR-mRNA-Expression hervor. Je nach Untergruppe erzielte eine TGF- $\beta$ -Konzentration von 0,5 ng/mL einen zeitabhängigen Anstieg der VDR-Genexpression um das drei- bis maximal 8,5-fache nach 24 h und um das 2,9- bis 4,6-fache nach 48 h (Abbildung 24 A, C, E). Interessanterweise erzielte die Gabe von 2 ng/mL TGF- $\beta$  nach 24 h in den jeweiligen Untergruppen keine signifikant stärkere VDR-mRNA-Expression im Bezug auf eine 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Behandlung (Abbildung 24 A, C, E). Jedoch konnte eine Konzentration von 2 ng/mL im Gegensatz zur 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  die gesteigerte VDR-Genexpression in pHSC von HCV-Patienten konstant und in pHSC von HBV- und Virus-unbelasteten Patienten erhöhen (Abbildung 24 A, C, E). Eine Behandlung der mit 0,5 bzw. 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC mit VD<sub>2</sub> bewirkte in keiner Untergruppe einen Unterschied hinsichtlich der VDR-mRNA-Expression (Abbildung 24 A, C, E).

Die ermittelten VDR-Genexpressionsveränderungen wurden im Anschluss auf Proteinebene überprüft. Die Gabe von exogenem TGF- $\beta$  bewirkte auch eine Steigerung der VDR-Proteinexpression. Jedoch konnte bei einer verwendeten Menge von 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  keine Virus-abhängige Expressionsstärke innerhalb des Untersuchungszeitraumes beobachtet werden (Abbildung 24 B, D, F; Abbildung 25). Auch die Reduktion der VDR-Genexpression nach 48 h Behandlung wurde nicht gefunden (Abbildung 24 B, D, F; Abbildung 25). Im Bezug zur Kontrolle erzielte die Stimulation der Zellen mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  in pHSC von HCV-Patienten einen konstanten Anstieg um das 4,7-fache im untersuchten Zeitraum. Im Gegensatz dazu steigerte sich die VDR-Proteinexpression über die Zeit in pHSC von HBV-positiven Patienten (24 h vs. 48 h:  $p = 0,088$ ) und von Virus-unbelasteten Patienten (24 h vs. 48 h:  $0,065$ ) (Abbildung 24 B, D, F; Abbildung 25). In primären hHSC rief eine Behandlung mit VD<sub>2</sub> keine Änderung der VDR-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle hervor.

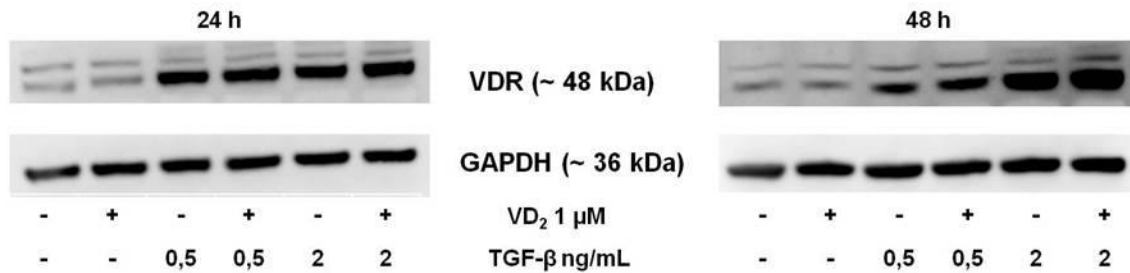


**Abbildung 24: Virus-abhängige VDR-Expression in pHSC.**

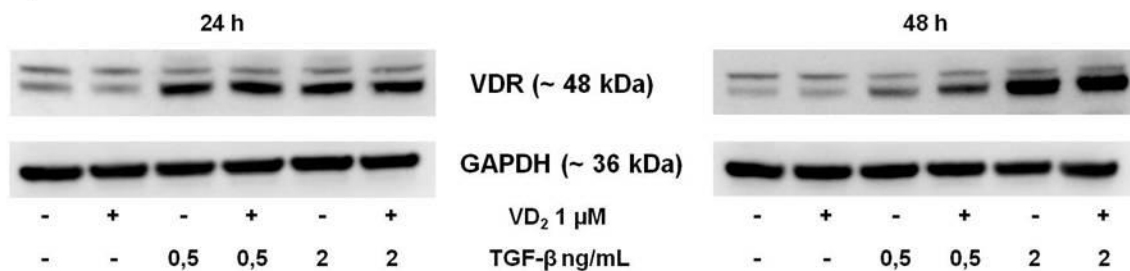
Graphische Darstellung der relativen VDR-mRNA- bzw. deren Proteinexpressionen in Virus-unbelasteten (A, B), HBV- (C, D) und HCV-belasteten (E, F) pHSC aus  $n = 8$  bzw.  $n = 6$  unabhängigen Experimenten, welche als  $MW \pm SEM$  angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's  $t$ -Test, betrug  $p < 0,05$ . Eine exogene TGF- $\beta$ -Stimulation verursachte eine Induktion der VDR-Expression, welche durch VD<sub>2</sub> nicht verändert wurde.

Auch die durch exogenes TGF- $\beta$  verursachten Proteinexpressionsänderungen wurden durch die Gabe von VD<sub>2</sub> weder nach 24 noch nach 48 h beeinflusst (Abbildung 24 B, D, F; Abbildung 25).

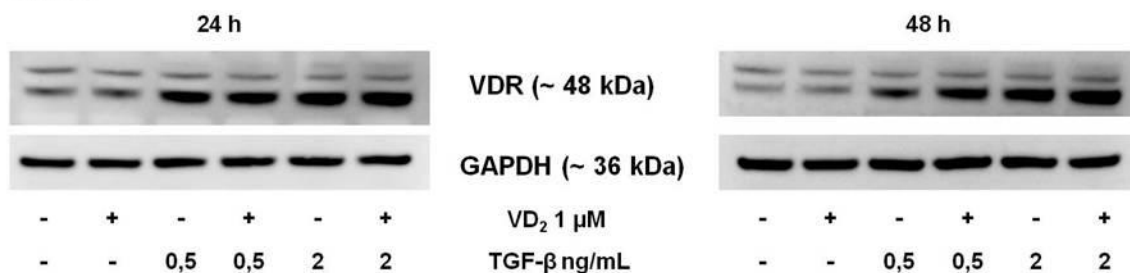
**A) Virus-unbelastet**



**B) HBV**



**C) HCV**



**Abbildung 25: Detektion der VDR-Expression mittels Western-Blot.**

Repräsentative Western-Blots der VDR-Expression in Virus-unbelasteten (A), HBV- (B) und HCV-belasteten pHSC nach 24 h und 48 h Behandlung mit TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub>.

Zusammenfassend konnte in unstimulierten und stimulierten pHSC keine Wirkung von VD<sub>2</sub> auf die VDR-Expression detektiert werden.

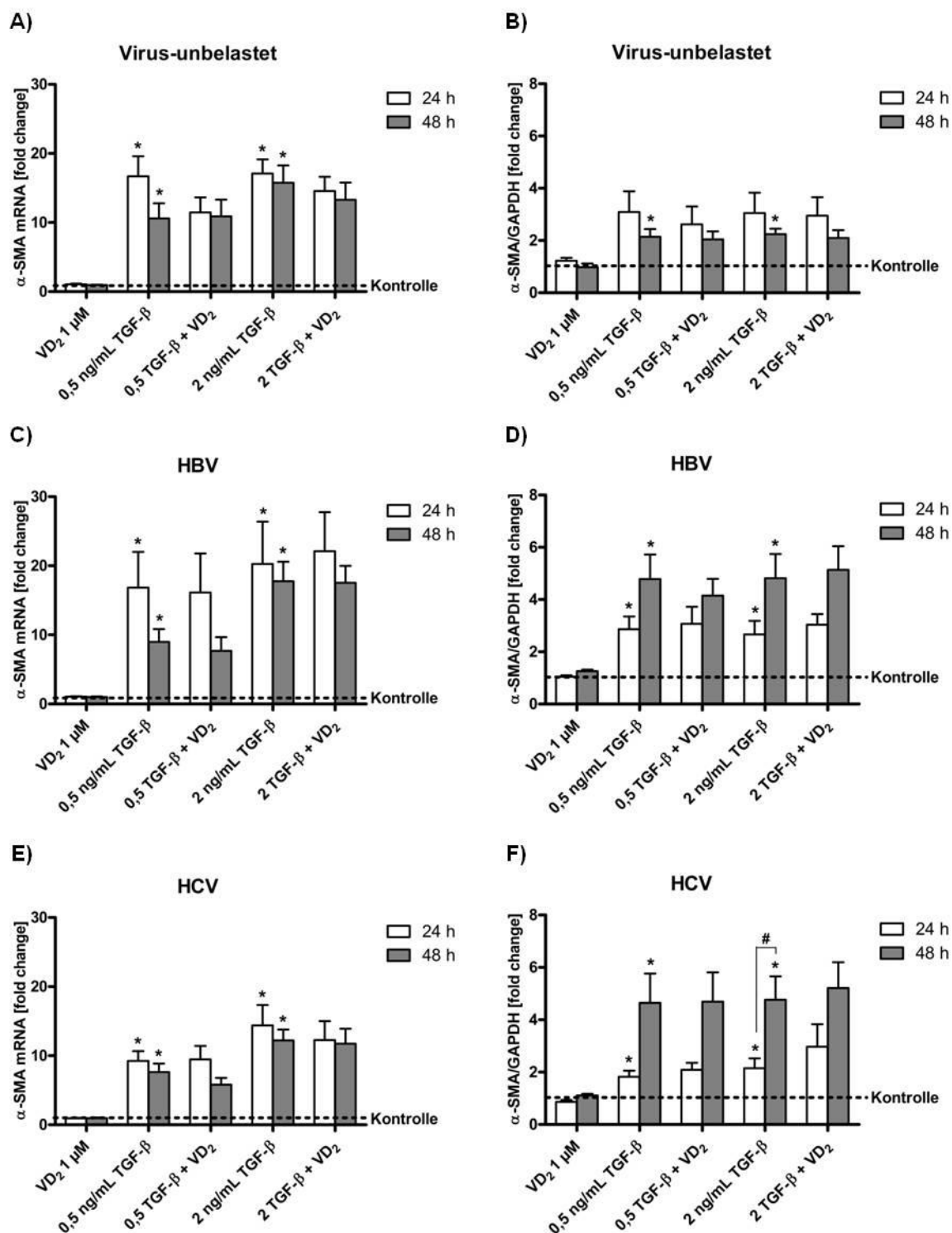
**3.2.4.2.2 VD<sub>2</sub>-Wirkung auf die Strukturproteinexpression von  $\alpha$ -SMA in pHSC**

Die Untersuchung des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA sollte Aufschluss zur VD<sub>2</sub>-Wirkung bezüglich der HSC-Aktivierung und Transdifferenzierung geben. Wie Abbildung 26 entnommen werden kann, bewirkte im Vergleich zur Kontrolle eine Behandlung der pHSC mit VD<sub>2</sub> Virus-unabhängig keine Änderung der  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression im untersuchten Zeitraum. Wie schon in der Konzentrationswirkungskurve gezeigt, erzielten TGF- $\beta$ -Konzentrationen von sowohl 0,5 ng/mL (Virus-unbelastet:  $p = 0,0004$ ;

HBV:  $p = 0,0284$ , HCV:  $p = 0,0022$ ) als auch 2 ng/mL (Virus-unbelastet:  $p < 0,0001$ ; HBV:  $p = 0,0256$ , HCV:  $p = 0,0027$ ) in allen Untergruppen eine signifikant verstärkte Induktion der Genexpression nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 26 A, C, E). Nach 48-stündiger Stimulation der pHSC mit 0,5 ng/mL wurde gegenüber der 24-stündigen Behandlung eine tendenzielle Reduktion der mRNA-Expression verzeichnet, welche jedoch gegenüber der Kontrolle weiterhin signifikant erhöht blieb (Virus-unbelastet:  $p = 0,0072$ ; HBV:  $p = 0,008$ , HCV:  $p = 0,0029$ ) (Abbildung 26 A, C, E). Demgegenüber zeigte sich innerhalb der Untergruppen in den mit 2 ng/mL TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC ein annähernd gleicher Expressionsgrad von  $\alpha$ -SMA über die Zeit (Abbildung 26 A, C, E). Ausschließlich in pHSC von Virus-unbelasteten Patienten konnte in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC durch Zugabe von VD<sub>2</sub> nach 24 h eine abgemilderte mRNA-Expression von  $\alpha$ -SMA im Bezug zu 0,5 ng/mL behandelte pHSC (Abbildung 26 A) beobachtet werden. Diese tendenzielle Reduktion wurde über die Zeit jedoch nicht aufrechterhalten werden (Abbildung 26 A). Vitamin D<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -SMA-Genexpression in Zellen mit exogener 2 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation (Abbildung 26 A, C, E). Eine marginale Verminderung der  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression zeigte sich in pHSC von HCV-Patienten mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  Vorstimulation nach 48-stündiger Behandlung mit VD<sub>2</sub>. (Abbildung 26 E).

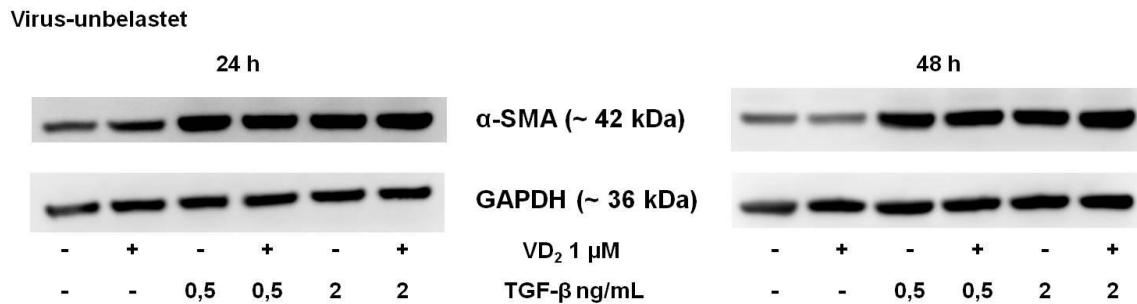
Die Untersuchung der Wirkung von VD<sub>2</sub> in TGF- $\beta$  unstimulierten pHSC auf die  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression untermauerte in den verwendeten pHSC-Untergruppen die ermittelte unveränderte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 26 B, D, F und Abbildung 27). In Virus-unbelasteten pHSC wurde zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine konzentrationsunabhängige Erhöhung der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression durch Zugabe von exogenen TGF- $\beta$  verzeichnet (Ko vs. 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ : 24 h  $p = 0,059$  und 48 h  $p = 0,019$ ; Ko vs. 2 ng/mL TGF- $\beta$ : 24 h  $p = 0,058$  und 48 h  $p = 0,0041$ ) (Abbildung 26 B und Abbildung 27). Des Weiteren war eine zeitabhängige tendenzielle Reduktion der  $\alpha$ -SMA-Proteinexpressionsstärke beobachtbar (Abbildung 26 B und Abbildung 27). Auch in den Virus-belasteten pHSC stieg die Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA TGF- $\beta$ -konzentrationsunabhängig im Vergleich zur Kontrolle signifikant an (Abbildung 26 D, F). Jedoch zeigte sich in diesen Untergruppen keine zeitabhängige Reduktion, sondern eine verstärkte Expression des  $\alpha$ -SMA-Proteins nach 48 h (Abbildung 26 D, F). In durch exogenen TGF- $\beta$  stimulierten pHSC erzielte die Behandlung mit VD<sub>2</sub> keine Änderung der Expression des Proteins (Abbildung 26 B, D, F).





**Abbildung 26: Virus-abhängige α-SMA-Expression in pHSC nach TGF-β und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen α-SMA-mRNA- bzw. deren Proteinexpressionen in Virus-unbelasteten (A, B) sowie HBV- (C, D) und HCV-belasteten (E, F) pHSC aus n = 8 bzw. n = 6 unabhängigen Experimenten, welche als MW ± SEM angegeben sind. Die Signifikanzniveaus (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's *t*-Test, betrugen  $p < 0,05$ . Eine exogene TGF-β-Stimulation induzierte die α-SMA-Expression. In Virus-unbelasteten pHSC milderte VD<sub>2</sub> die α-SMA-Expression tendenziell ab.



**Abbildung 27: Detektion der α-SMA-Expression in Virus-unbelasteten pHSC mittels Western-Blot.**

Darstellung eines repräsentativen Western-Blots am Beispiel Virus-unbelasteter pHSC.

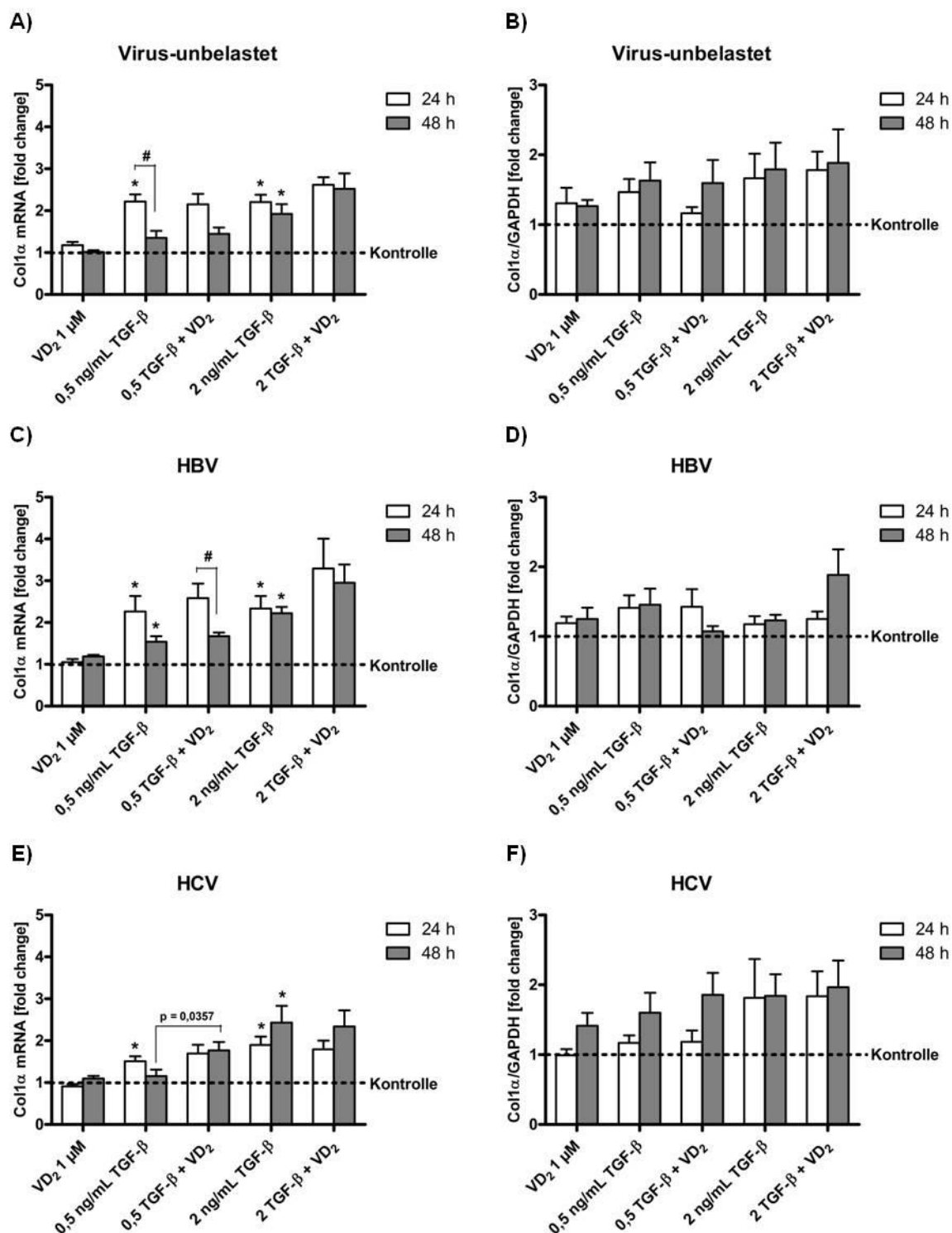
Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass ausschließlich in Virus-unbelasteten pHSC mit 0,5 ng/mL TGF-β-Stimulation eine VD<sub>2</sub>-Supplementation die α-SMA-Genexpression verringerte.

### 3.2.4.2.3 Wirkungen von TGF-β und VD<sub>2</sub> auf die Expression von Col1α in pHSC

Zur Abklärung des möglichen therapeutischen Potentials von VD<sub>2</sub> in der Leberfibrose wurde aufgrund der exzessiven Synthese und Deposition von ECM während eines fibrotischen Prozesses das Col1α als Vertreter des fibrillären Kollagens untersucht (Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2010; Friedmann *et al.*, 2008a). Primäre hHSC, welche keinen zusätzlichen profibrotischen Stimulus erhielten, zeigten in der Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> für 24 h und 48 h ein Col1α-Genexpressionsmuster annähernd dem Kontrollniveau (Abbildung 28 A, C, E). Im Vergleich zur Kontrolle wurde durch exogene Stimulation der Zellen mit 0,5 ng/mL TGF-β nach 24-stündiger Inkubation in allen drei Untergruppen ein signifikanter Anstieg der Col1α-mRNA-Expression (Virus-unbelastet:  $p < 0,0001$ ; HBV:  $p = 0,0181$ , HCV:  $p = 0,0132$ ) beobachtet (Abbildung 28 A, C, E). Dieser signifikante Anstieg reduzierte sich nach 48-stündiger Inkubation in den jeweiligen Untergruppen in unterschiedlichem Maße (Abbildung 28 A, C, E). Ein stärkerer profibrotischer exogener Stimulus verursachte im Vergleich zur verwendeten TGF-β-Konzentration von 0,5 ng/mL nach 24 h keine weitere Steigerung der Col1α-Genexpression (Abbildung 28 A, C, E). Jedoch wurde nach 48 h in allen Untergruppen weiterhin ein signifikanter Anstieg der Col1α-mRNA im Vergleich zur Kontrolle aufrecht gehalten (Abbildung 28 A, C, E). In der Untergruppe der pHSC von HCV-Patienten stieg die Col1α-Genexpression zeitabhängig tendenziell an (Abbildung 28 E). Im Vergleich zur Einzelbehandlung der

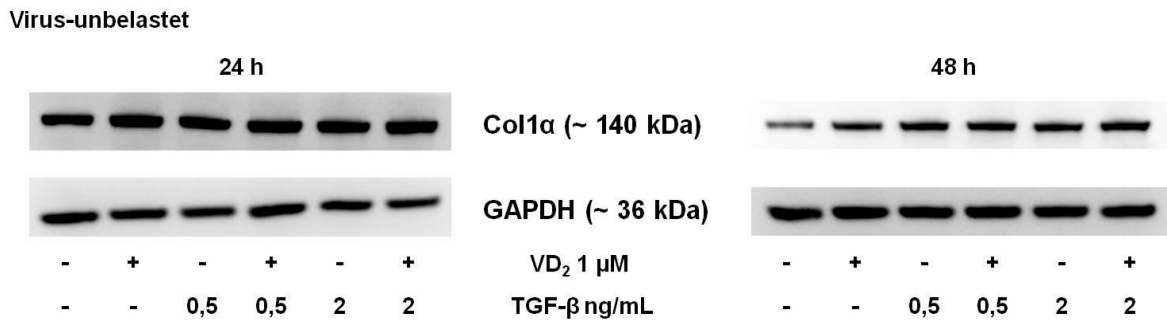
phHSC mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  steigerte sowohl in Virus-unbelasteten als auch in HBV-belasteten phHSC die VD<sub>2</sub>-Supplementation die Col1 $\alpha$ -Genexpression tendenziell zu beiden Zeitpunkten (Abbildung 28 A, B). In der Untergruppe der phHSC von HCV-Patienten wurde dieser Effekt bei Zellen, die mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimuliert worden waren, nicht beobachtet. Jedoch verursachte eine Gabe von VD<sub>2</sub> in phHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  Vorstimulation nach 48 h einen signifikanten Anstieg der Col1 $\alpha$ -mRNA-Expression (0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ +VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0357$ ) (Abbildung 28 E).

Wie in Abbildung 28 B und D dargestellt, zeigte sich in den Untergruppen der Virus-unbelasteten und HBV-belasteten phHSC zu beiden Zeitpunkten und in den phHSC von HVC-Patienten nach 48 h durch die Behandlung mit VD<sub>2</sub> eine geringfügige Steigerung der Proteinexpression von Col1 $\alpha$ . Die in den Virus-unbelasteten phHSC durch TGF- $\beta$ -Stimulation hervorgerufenen Erhöhungen der Col1 $\alpha$ -Proteinexpression konnten ausschließlich nach 24 h in 0,5 ng/mL vorstimulierten phHSC durch VD<sub>2</sub>-Supplementation abgemildert werden (Abbildung 28 B; Abbildung 29). Während sich in den phHSC ohne Viruslast die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression konzentrations- und zeitunabhängig steigerte, wurde in den phHSC von HBV-Patienten eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet. Stimulation der phHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  bewirkte tendenziell eine stärkere Induktion der Proteinexpression als eine 2 ng/mL TGF- $\beta$ -Behandlung (Abbildung 28 D). Während eine Supplementation der mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten phHSC mit VD<sub>2</sub> nach 48 h die Col1 $\alpha$ -Expression nahezu dem Kontrollniveau inhibierte, begünstigte sie in mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten Zellen die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression (Abbildung 28 D). Eine exogene TGF- $\beta$  Konzentration von 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  erzielte erst nach 48 h in HCV-belasteten phHSC einen Anstieg der Col1 $\alpha$ -Proteinsynthese (Abbildung 28 E). Durch die Verwendung einer 2 ng/mL TGF- $\beta$ -Konzentration wurde die Induktion der Proteinsynthese schon nach 24 h Behandlung erreicht (Abbildung 28 E). Während in unstimulierten phHSC eine VD<sub>2</sub>-Gabe nach 48 h die Col1 $\alpha$ -Expression tendenziell induzierte (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p = 0,092$ ), wies eine VD<sub>2</sub>-Supplementation im Vergleich zu vorstimulierten phHSC keine Effekte auf das Expressionsverhalten des Col1 $\alpha$ -Proteins auf (Abbildung 28 E).



**Abbildung 28: Virus-abhängige Expression von Col1α in pHSC nach TGF-β- und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Col1α-mRNA- bzw. deren Proteinexpressionen in Virus-unbelasteten (A, B), HBV- (C, D) und HCV-belasteten (E, F) pHSC aus n = 8 bzw. n = 6 unabhängigen Experimenten, welche als MW ± SEM angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's *t*-Test, betrug  $p < 0,05$ . Exogene TGF-β-Stimulation induzierte tendenziell Virus-abhängig die Col1α-Expression. In Virus-unbelasteten und HBV-belasteten pHSC milderte VD<sub>2</sub> die Col1α-Expression tendenziell ab.



**Abbildung 29: Detektion der Col1α-Expression in Virus-unbelasteten pHSC.**

Darstellung eines repräsentativen Western-Blots am Beispiel Virus-unbelasteter pHSC.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass in mit 0,5 ng/mL TGF-β vorstimulierten Virus-unbelasteten und HBV-belasteten pHSC eine VD<sub>2</sub>-Supplementation die Col1α-Proteinsynthese abmilderte. Demgegenüber begünstigte die Gabe von VD<sub>2</sub> die Col1α-Proteinsynthese in mit 2 ng/mL TGF-β vorstimulierten pHSC von HBV-Patienten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VD<sub>2</sub> keine eindeutige therapeutisch-protective Wirkung auf TGF-β-stimulierte HSC hat, sondern dass seine mögliche Wirkung im Patienten immer im Zusammenhang mit der TGF-β-Konzentration, Virusbelastung (und ggf. weiterer Parameter) beurteilt werden sollte.

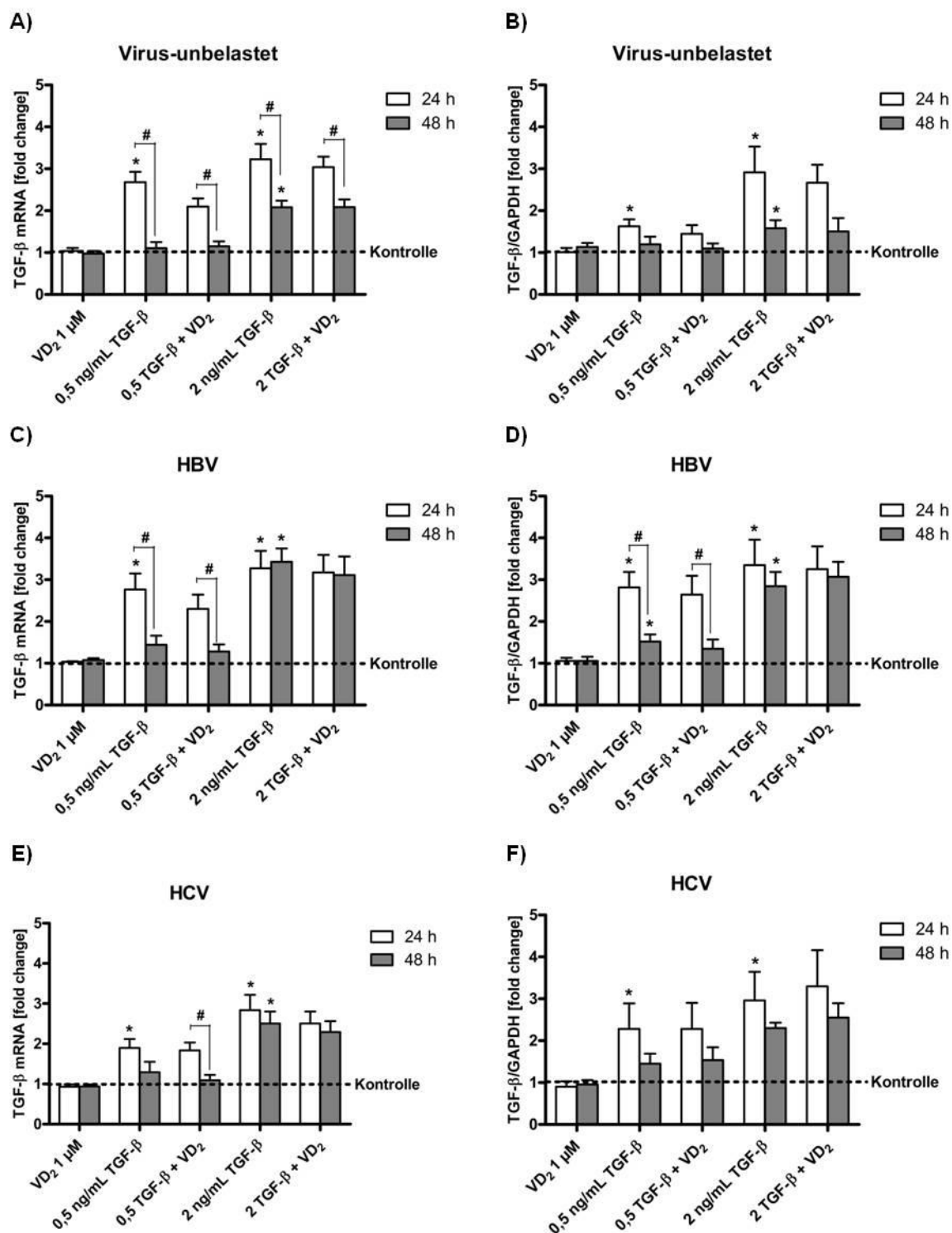
#### 3.2.4.2.4 VD<sub>2</sub>- und TGF-β-Wirkung auf das endogene Zytokin TGF-β in pHSC

Das Zytokin TGF-β, welches während der HSC-Aktivierung in seiner Synthese gesteigert wird (Dooley *et al.*, 2000), stimuliert in der Fibrogenese der HSC die Kollagensynthese nicht nur parakrin sondern auch über einen autokrinen Rückkopplungsmechanismus (Li *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008). Somit sollte in diesem Abschnitt überprüft werden, ob die unter 3.2.4.2.2 und 3.2.4.2.3 beobachteten Steigerungen der α-SMA- und Col1α-Expressionen ausschließlich über die exogene Zugabe von TGF-β hervorgerufen wurden oder aber eine Beteiligung des endogenen TGF-β erfolgt. Des Weiteren sollte der im Rattensteatohepatitismodell nachgewiesene *in vivo*-Benefit von Vitamin D auf die TGF-β-Expression (Nakano *et al.*, 2011) *in vitro* in pHSC überprüft werden.

In TGF-β unstimulierten pHSC verursachte die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> zu keinem untersuchten Zeitpunkte und in keiner Untergruppe eine Änderung der TGF-β-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30 A, C, E). Exogenes TGF-β (0,5 ng/mL und 2 ng/mL) stimulierte in allen Untergruppen in unterschiedlichem Ausmaß die endogene TGF-β-mRNA-Synthese nach 24 h

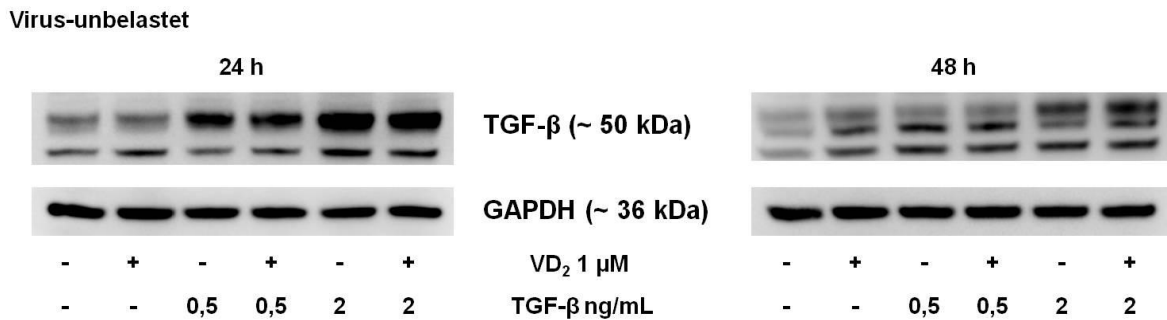
signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30 A, C, E). Des Weiteren zeigten alle Untergruppen nach 48-stündiger 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Behandlung eine Reduktion der endogenen TGF- $\beta$ -Genexpression annähernd dem Kontrollniveau (Abbildung 30 A, C, E). Im Gegensatz zu den pHSC viraler Patienten mit gleichbleibender TGF- $\beta$ -Genexpressionsstärke wurde in den Virus-unbelasteten pHSC bei einer exogenen 2 ng/mL TGF- $\beta$  Behandlung eine zeitabhängige signifikante Reduktion der TGF- $\beta$ -mRNA detektiert (Abbildung 30 A). Ausschließlich in 0,5 ng/mL vorstimulierten Virus-unbelasteten pHSC erzielte eine 24-stündige Behandlung dieser Zellen mit VD<sub>2</sub> eine tendenzielle Reduktion der TGF- $\beta$ -Genexpression ( $p = 0,08$ ) (Abbildung 30 A). Nach 48 h bewirkte die Gabe von VD<sub>2</sub> in 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten, Virus-unbelasteten pHSC keine weitere Reduktion der TGF- $\beta$ -mRNA-Expression unterhalb des Kontrollniveaus (Abbildung 30 A). In allen Untergruppen beeinflusste VD<sub>2</sub> zu keinem untersuchten Zeitpunkt die endogene TGF- $\beta$ -Genexpression in mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC (Abbildung 30 A, C, E).

Analog zur Genexpressionsuntersuchung veränderte die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> weder in Virus-unbelasteten noch in Virus-belasteten pHSC in der untersuchten Zeit die Proteinexpression von TGF- $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30). Während bei der Genexpression eine Stimulation der pHSC durch 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  in Zellen von HCV-Patienten den geringsten Anstieg von TGF- $\beta$  aufwies, wurde auf Proteinebene der geringste Anstieg von TGF- $\beta$ -Protein in der Gruppe der Virus-unbelasteten pHSC verzeichnet (Abbildung 30 B; Abbildung 31). Der durch 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  hervorgerufene zeitliche Stimulationsverlauf von TGF- $\beta$  in der Genexpression konnte auf Proteinebene in den jeweiligen Untergruppen bestätigt werden. Auch wurde durch 2 ng/mL TGF- $\beta$  die endogene TGF- $\beta$ -Proteinexpression im untersuchten Zeitraum in den jeweiligen pHSC-Gruppen konstant signifikant im Bezug zur Kontrolle gesteigert (Abbildung 30 B, D, F). Die nach 24 h durch VD<sub>2</sub>-Zugabe detektierte, verminderte TGF- $\beta$ -mRNA-Expression in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten Virus-unbelasteten Zellen wurde auf Proteinebene nicht erzielt (Abbildung 30 B und Abbildung 31). Keine Behandlung vorstimulierter pHSC mit VD<sub>2</sub> führte zu einer Verbesserung der Expression des profibrotischen Proteins TGF- $\beta$  (Abbildung 30 B, D, F).



**Abbildung 30: Virus-abhängige Expression von TGF-β in pHSC nach TGF-β und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen TGF-β-mRNA- bzw. deren Proteinexpressionen in Virus-unbelasteten (A, B), HBV- (C, D) und HCV-belasteten (E, F) pHSC aus n = 8 bzw. n = 6 unabhängigen Experimenten, welche als MW ± SEM angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's *t*-Test, betrug p < 0,05. Eine exogene TGF-β-Stimulation induzierte Virus-abhängig die Expression von TGF-β. Eine VD<sub>2</sub>-Supplementation veränderte die Expression des TGF-β nicht signifikant.



**Abbildung 31: Detektion der TGF- $\beta$ -Expression in Virus-unbelasteten pHSC mittels Western-Blot.**

Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot der TGF- $\beta$ -Expression am Beispiel Virus-unbelasteter pHSC.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine exogene TGF- $\beta$ -Gabe in den pHSC die endogene TGF- $\beta$ -Synthese induzierte. Ausschließlich in pHSC ohne HCV- und HBV-Belastung erzielte eine VD<sub>2</sub>-Supplementation eine tendenziell verringerte TGF- $\beta$ -Genexpression, welche auf der Ebene der Proteinexpression jedoch nicht wiedergefunden wurde.

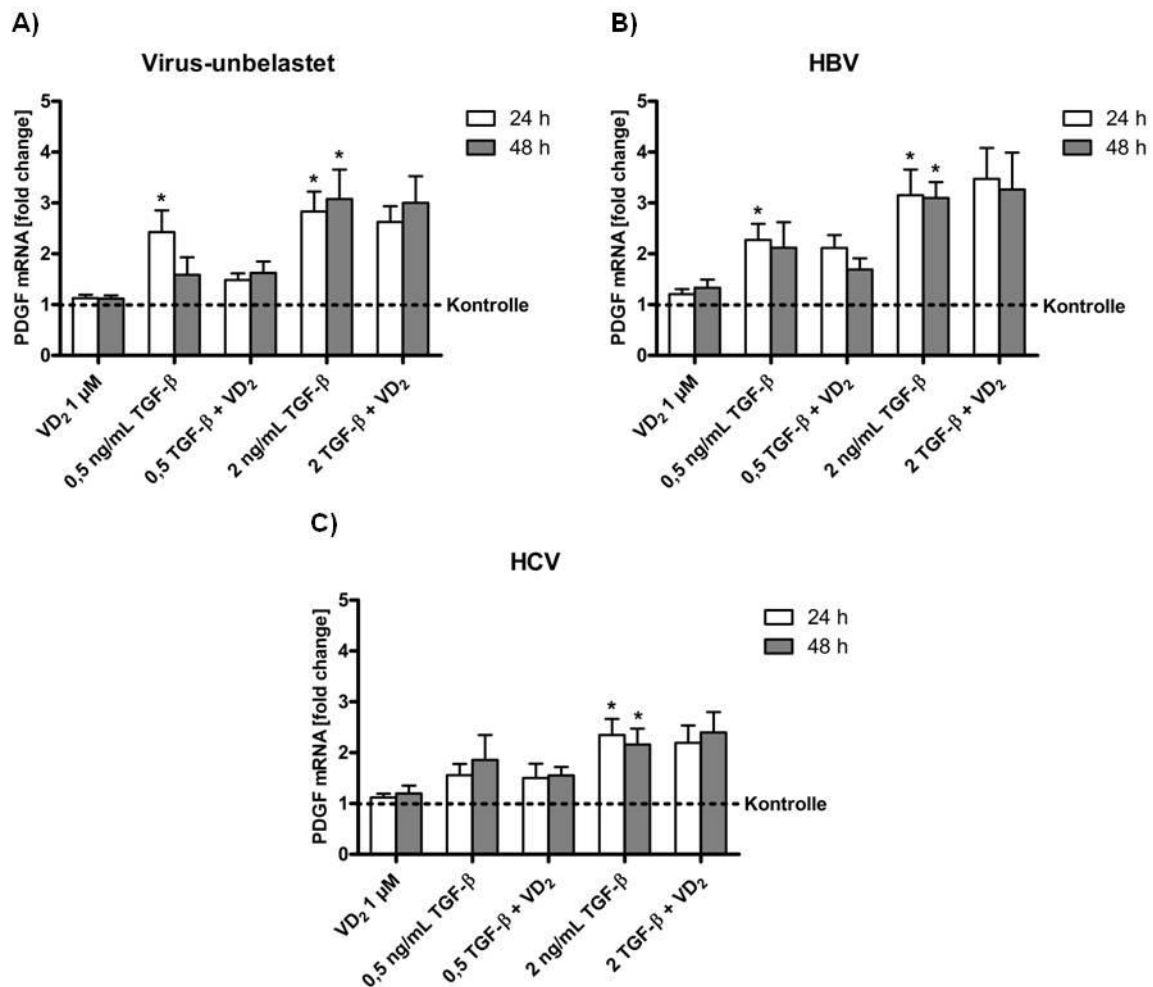
### 3.2.4.2.5 VD<sub>2</sub>- und TGF- $\beta$ -Wirkung auf die PDGF-Expression in pHSC

Neben TGF- $\beta$  gilt PDGF als Schlüsselmediator der profibrotischen und proinflammatorischen Wirkungen in HSC (Friedman *et al.*, 2008a; Jiao *et al.*, 2009; Tsukada *et al.*, 2006). Die Aktivierung der HSC geht mit einem veränderten Proliferationsverhalten dieser Zellen einher, wobei PDGF als potentestes Mitogen angesehen wird (Ghiassi-Nejad *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2008a; Pinzani *et al.*, 1999; Tsukada *et al.*, 2006). Eine antiproliferative Wirkung von Vitamin D konnte in verschiedenen Karzinomzelllinien, wie Mausleukämiezellen (Abe *et al.*, 1981), MCF-7-Brustkrebszellen (Sundaram *et al.*, 2003) und in transformierten Hepatozyten von HCC-Patienten (Dalhoff *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. In diesem Abschnitt sollte daher analysiert werden, ob sich VD<sub>2</sub> durch die Modulation des PDGF-Zytokins positiv auf die HSC-Proliferation auswirkte.

TGF- $\beta$  unstimulierte pHSC zeigten auch hinsichtlich des mitogenen Faktors PDGF durch eine Behandlung mit VD<sub>2</sub> für 24 h bzw. 48 h keine Änderung in der PDGF-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 32). In allen untersuchten pHSC-Gruppen erzielte eine Behandlung der Zellen mit exogenem TGF- $\beta$  nach 24 h eine signifikante Induktion der PDGF-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 32): Wie hier dargestellt, wurde ausschließlich in Virus-unbelasteten Zellen bei einer Behandlung mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  eine zeitabhängige tendenzielle



Reduktion der PDGF-Genexpression verzeichnet (Abbildung 32 A). Eine Konzentration von 2 ng/mL TGF- $\beta$  bewirkte über den untersuchten Zeitraum eine konstante Steigerung der PDGF-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Virus-abhängige Expression von PDGF in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von PDGF in Virus-unbelasteten (A), HBV- (B) und HCV-belasteten (C) pHSC aus  $n = 8$  unabhängigen Experimenten, welche als  $MW \pm SEM$  angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*), berechnet mittels Student's  $t$ -Test, betrug  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle bzw. zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Ausschließlich in Virus-unbelasteten pHSC milderte die Gabe von VD<sub>2</sub> die durch TGF- $\beta$  induzierte PDGF-mRNA-Expression ab.

Interessanterweise verursachte ausschließlich in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten Virus-unbelasteten Zellen eine Gabe von VD<sub>2</sub> nach 24 h eine Reduktion der mRNA-Expression von PDGF ( $p = 0,06$ ) (Abbildung 32 A). Bei Virusbelastung der pHSC wurde nach 24 h in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC keine Reduktion der PDGF-mRNA-Menge durch eine VD<sub>2</sub>-Behandlung gefunden (Abbildung

32 B, C). In mit 2 ng/mL vorstimulierten pHSC bewirkte VD<sub>2</sub> keine Wirkung hinsichtlich der PDGF-Genexpression (Abbildung 32).

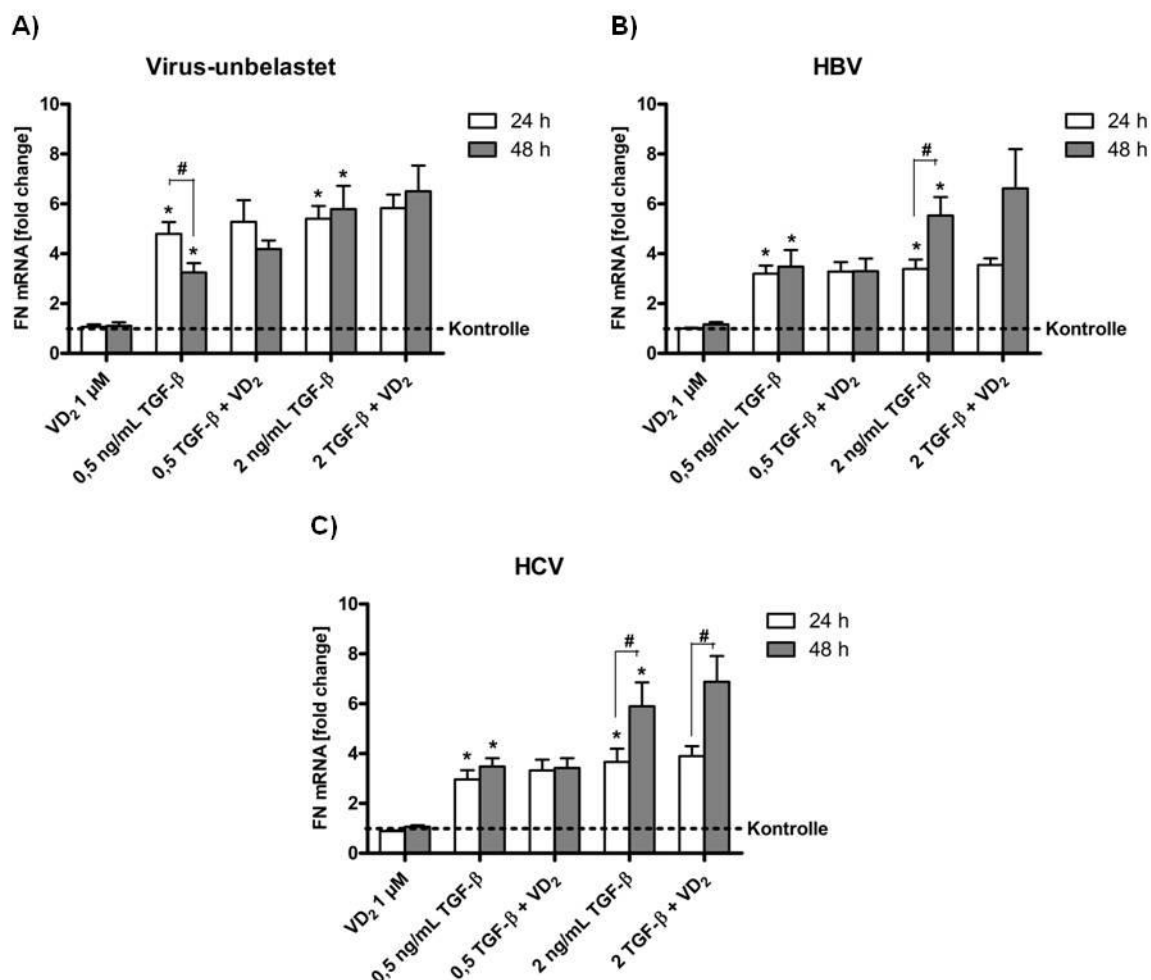
Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich in Virus-unbelasteten Zellen die durch 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  hervorgerufene PDGF-Genexpression durch eine VD<sub>2</sub>-Supplementation gehemmt werden konnte.

Die limitierte Menge an isolierten pHSC ermöglichte keine Bestimmung der PDGF-Proteinmenge.

#### **3.2.4.2.6 VD<sub>2</sub>- und TGF- $\beta$ -Wirkung auf die Fibronektin-Expression in pHSC**

Obwohl mehrfach beschrieben worden ist, dass die Fibronektin-Synthese infolge einer TGF- $\beta$ -Gabe ansteigt (Friedman *et al.*, 2008a; Tsukada *et al.*, 2006) konnten Kawelke *et al.* (2011) zeigen, dass Fibronektin durch eine Modulation von verfügbarem TGF- $\beta$  und dem Ansprechen der HSC auf aktives TGF- $\beta$  vor exzessiver Leberfibrose schützt. Diese Arbeitsgruppe konnte sowohl im *in vivo*-Mausmodell als auch in HSC nachweisen, dass eine Depletion von Fibronektin die Kollagen-Synthese und den Progress der Fibrose fördert (Kawelke *et al.*, 2011). Nachdem in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine TGF- $\beta$ -Behandlung die zelluläre Expression profibrotischer Marker stimuliert, sollte im Anschluss die Expression des Fibronektins hinsichtlich der TGF- $\beta$ -Stimulation und VD<sub>2</sub>-Behandlung überprüft werden.

Eine Behandlung mit VD<sub>2</sub> führte in TGF- $\beta$  unstimulierten pHSC in keiner der drei Gruppen zu einer deutlichen Änderung der FN-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 33). Die in einer früheren Studie beschriebene exzessive Synthese von Fibronektin infolge einer TGF- $\beta$ -Gabe (Kanzler *et al.*, 1999) konnte in pHSC durch eine Stimulation mit 0,5 ng/mL und 2 ng/mL TGF- $\beta$  in allen untersuchten pHSC anhand signifikanter Anstiege zu beiden Zeitpunkten untermauert werden (Abbildung 33). Bei der Betrachtung der einzelnen Gruppen fiel auf, dass eine Behandlung mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  in Virus-belasteten pHSC eine relativ konstante FN-Genexpression und in Virus-unbelasteten Zellen eine Reduktion nach 48h verursachte (Abbildung 33). Das fettlösliche VD<sub>2</sub> provozierte ausschließlich in Virus-unbelasteten, mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC, nach 48 h eine tendenziell erhöhte FN-mRNA-Expression ( $p = 0,1$ ) (Abbildung 33 A). Unter keiner der anderen Konditionen erzielte VD<sub>2</sub> eine Wirkung auf die FN-Genexpression (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Virus-abhängige Expression von Fibronektin in pHSC nach TGF-β- und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von Fibronektin in Virus-unbelasteten (A), HBV- (B) und HCV-belasteten (C) pHSC aus  $n = 8$  unabhängigen Experimenten, welche als  $MW \pm SEM$  angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's  $t$ -Test, betrug  $p < 0,05$ . Die Gabe von VD<sub>2</sub> beeinflusste die durch TGF-β induzierte FN-mRNA-Expression nicht.

Die limitierte Menge isolierter pHSC ließ keine Detektion von Fibronektin auf Proteinebene zu.

Zusammenfassend ließ sich eine Erhöhung der FN-Genexpression durch VD<sub>2</sub> darstellen, wenn die Zellen virusfrei und mit 0,5 ng/mL TGF-β vorstimuliert waren.

Weiterhin zusammenfassend konnte besonders in den Virus-unbelasteten pHSC mit 0,5 ng/mL exogener TGF-β-Stimulation nach 24 h auf Genexpressionsebene durch eine Behandlung VD<sub>2</sub> eine Abmilderung der α-SMA-, TGF-β- und PDGF-Expression nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von HBV bzw. HVC verhinderte die in Virus-unbelasteten pHSC beobachtete VD<sub>2</sub>-Wirkung. Eine stärkere Stimulation

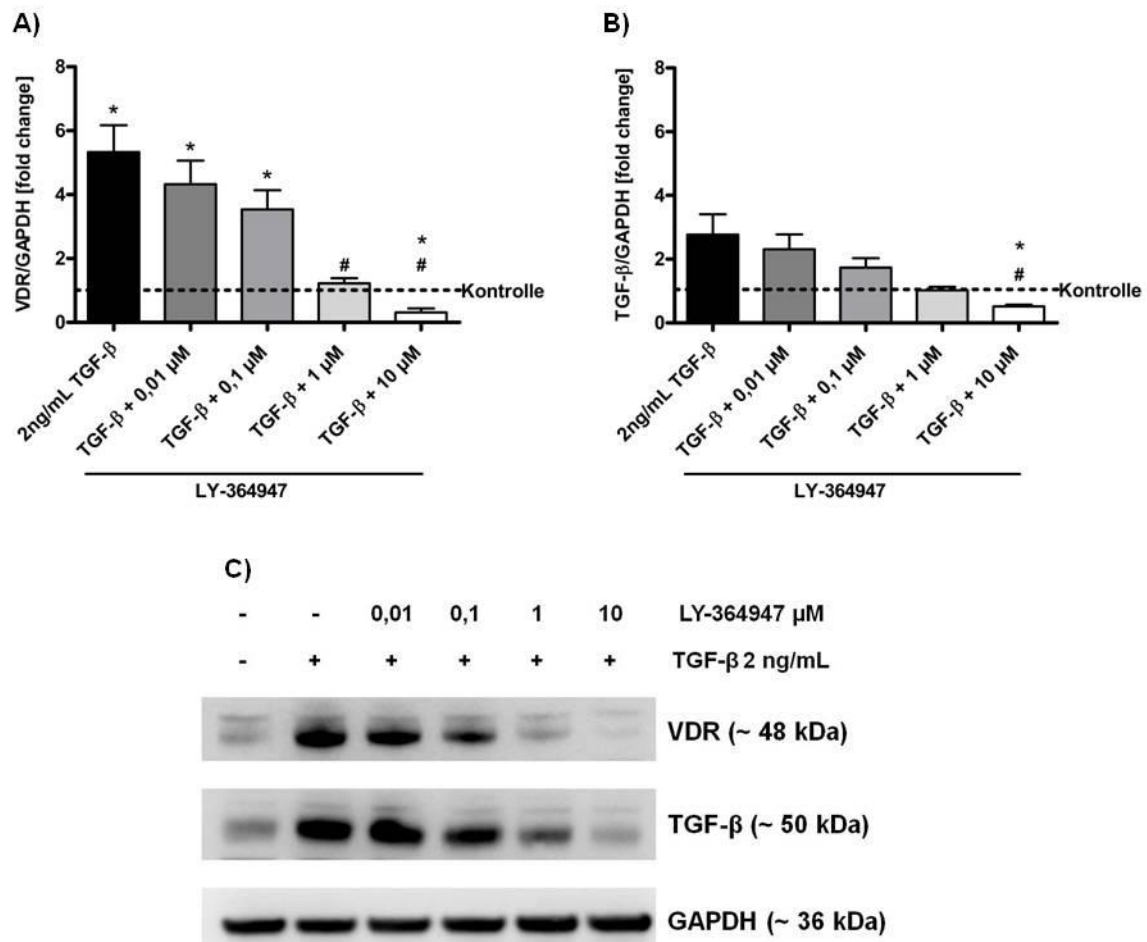
der Zellen durch Zugabe von 2 ng/mL exogenem TGF- $\beta$  verhinderte die positive Wirkung einer VD<sub>2</sub>-Behandlung auf die Zellen. Ein VD<sub>2</sub>-Effekt auf die Proteinexpression wurde ausschließlich bei mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -vorstimulierten Virus-unbelasteten Zellen nach 24 h erzielt.

Zudem konnte sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die in der Literatur beschriebene Selbstaktivierung mit einhergehender exogener TGF- $\beta$ -Unempfindlichkeit (De Mimics *et al.*, 2007; Dooley *et al.*, 2000) in den hier verwendeten Zellen nicht erfolgte.

### **3.3 Expression von TGF- $\beta$ , $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$ und des TGF- $\beta$ -Signalwegsmoleküls Smad2 in pHSC nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und einem TGF- $\beta$ -Rezeptor-Inhibitor nach 24 h**

In den vorherigen Experimenten förderte das pleiotrope Zytokin TGF- $\beta$  den fibrotischen Progress durch eine Induktion der HSC-Aktivierung (Anstieg der  $\alpha$ -SMA-, TGF- $\beta$ - und Col1 $\alpha$ -Expression). Dies setzt eine Modulation intrazellulärer Signalwege voraus. Zur Erzielung dieser Effekte aktiviert TGF- $\beta$  sowohl klassisch den Smad-Signalweg (Hanandez-Canaveral *et al.*, 2004; Nakao *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2003) als auch andere Signalwege wie *Transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1), ERK, *c-Jun N-terminale Kinase* (JNK) und p38 (Schnabl *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2012; Halder *et al.*, 2011). Wie mehrfach beschrieben, scheint jedoch der Smad-Signalweg eine herausragende Rolle in der Expression von  $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$  und TGF- $\beta$  zu spielen (Schnabl *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2012; Pinzani *et al.*, 2010). Dieser Zusammenhang wurde nachfolgend durch die Verwendung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Inhibitors LY-364947 überprüft. Virus-unbelastete pHSC, welche eine starke Vorstimulation durch Zugabe von 2 ng/mL TGF- $\beta$  erhielten, wurden mit diesem Inhibitor (10 nM – 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert und anschließend auf die Proteinexpression von VDR, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$  und den Smad-Signalwegmediator Smad2 getestet.

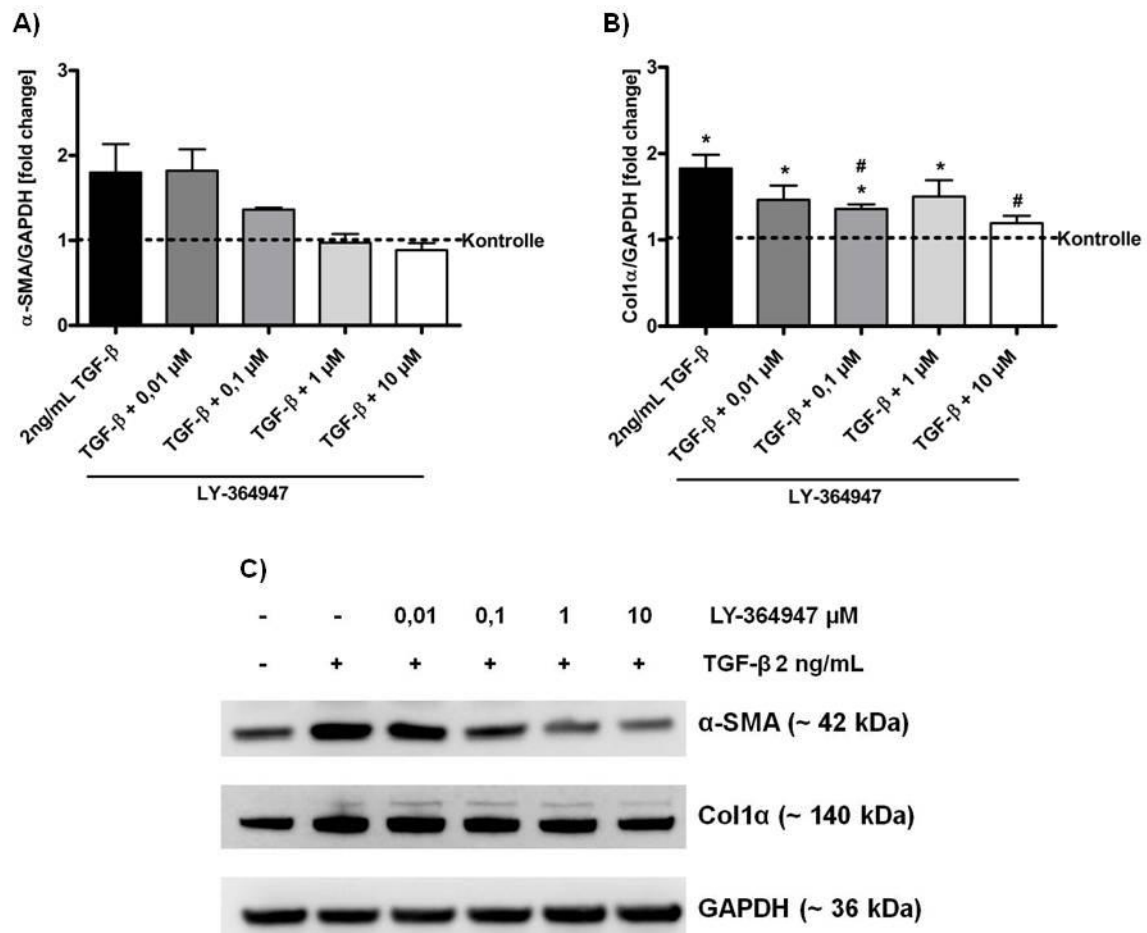
Der durch exogenes TGF- $\beta$  hervorgerufene signifikante Anstieg von VDR und TGF- $\beta$  in den pHSC wurde konzentrationsabhängig durch die Inhibition des TGF- $\beta$ -Rezeptors antagonisiert (Abbildung 34). Bei 10  $\mu$ M LY-364947 wurde die Expression von VDR und TGF- $\beta$  bis unter das Kontrollniveau inhibiert (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Inhibition der Expression von VDR und TGF-β durch LY-364947 in pHSC.**

Dargestellt sind die relativen Proteinexpressionen von VDR (A) und TGF-β (B) als  $MW \pm SEM$  aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western-Blots der VDR- und TGF-β-Expression. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Signifikanzen  $p < 0,05$  bezogen sich (\*) auf den Vergleich zur Kontrolle und (#) auf den Vergleich mit 2 ng/mL TGF-β. Die VDR- und TGF-β-Expression wurde über den Smad-Signalweg moduliert.

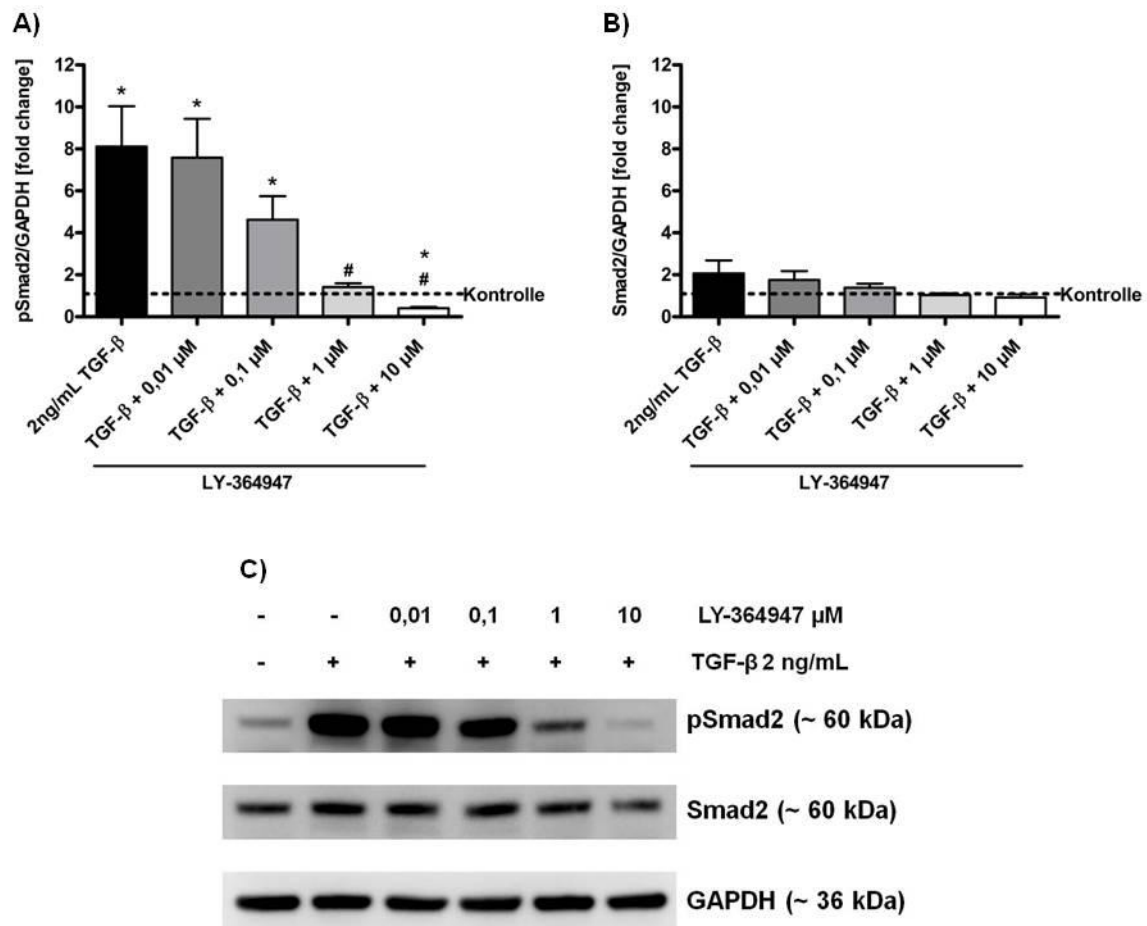
Eine durch die Gabe von exogenem TGF-β gesteigerte HSC-Aktivierung wurde durch die deutlich vermehrte Proteinexpression von α-SMA nachgewiesen (Abbildung 35 A, C). Die Inhibition des Smad-Signalweges verursachte konzentrationsabhängig die Reduktion der α-SMA-Synthese (Abbildung 35 A, C). Ebenfalls konnte die Col1α-Proteinexpression durch 2 ng/mL TGF-β im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (Abbildung 35 B, C). Die Inhibition des TGF-β-Rezeptors erzielte im Konzentrationsbereich nur geringe Verminderungen in der Col1α-Expression (Abbildung 35 B, C). Erst eine Konzentration von 10 μM hemmte die Kollagen-Synthese signifikant im Vergleich zur induktiven Behandlung mit 2 ng/mL TGF-β (Abbildung 35 B, C).



**Abbildung 35: Inhibition der Expression von  $\alpha$ -SMA und Col1a durch LY-364947 in pHSC.**

Dargestellt sind die relativen Proteinexpressionen von  $\alpha$ -SMA (A) und Col1a (B) als  $MW \pm SEM$  aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western-Blots der  $\alpha$ -SMA- und Col1a-Expression. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's  $t$ -Test berechnet. Signifikanzen  $p < 0,05$  bezogen sich (\*) auf den Vergleich zur Kontrolle und (#) auf den Vergleich mit 2 ng/mL TGF- $\beta$ . Die  $\alpha$ -SMA- und Col1a-Expression wurde über den Smad-Signalweg moduliert.

Um einen direkten Nachweis der veränderten Aktivität des Smad-Signalweges zu erbringen, wurde die Phosphorylierung des Smad2 in Abhängigkeit von exogenem TGF- $\beta$  und unter Verwendung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Inhibitors ermittelt. Wie in Abbildung 36 dargestellt, stimulierte exogenes TGF- $\beta$  den Smad-Signalweg signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die Blockade des TGF- $\beta$ -Rezeptors mittels LY-364947 verursachte eine konzentrationsabhängige Reduktion der phospho Smad2 (pSmad2)-Expression bei unveränderter Smad2-Expression (Abbildung 36).



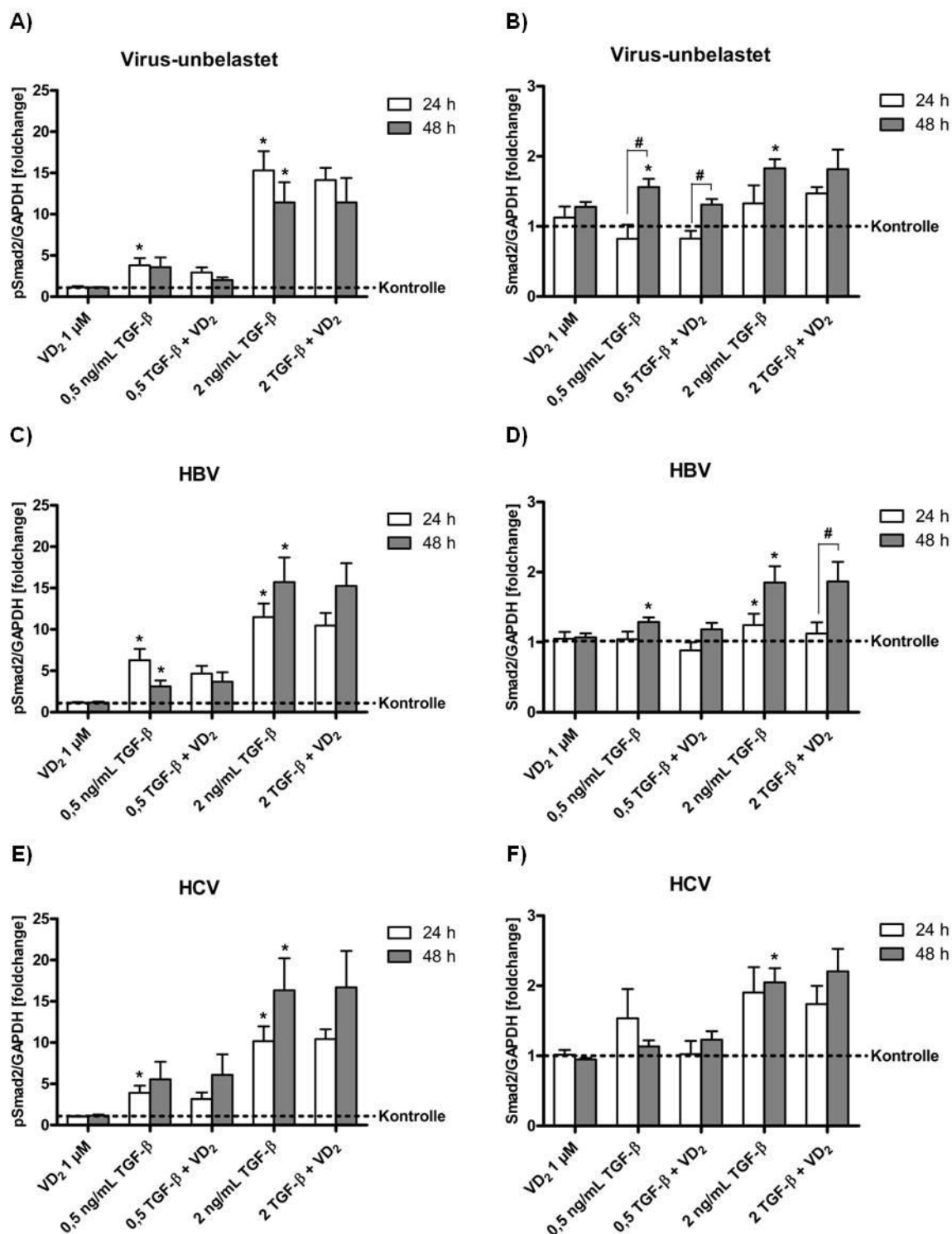
**Abbildung 36: Inhibition der Expression von pSmad2 und Smad2 durch LY-364947 in pHSC.**

Dargestellt sind die relativen Proteinexpressionen von pSmad2 (A) und Smad2 (B) als  $MW \pm SEM$  aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western-Blots der pSmad2- und Smad2-Expression. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's  $t$ -Test berechnet. Signifikanzen  $p < 0,05$  bezogen sich (\*) auf den Vergleich zur Kontrolle und (#) auf den Vergleich mit 2 ng/mL TGF- $\beta$ . LY-364947 inhibierte den Smad-Signalweg signifikant.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von VDR, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  durch eine Aktivierung des Smad-Signalweges hervorgerufen wurde.

### 3.3.1.1.1 Einfluss von TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> auf die Phosphorylierung des Smad-Signalwegsmediators Smad2 in pHSC

Der in früheren Studien von Zellkultur- (Schnabl *et al.*, 2001; Li-xia *et al.*, 2012) und Tiermodellen (Li-xia *et al.*, 2012; Tsukada *et al.*, 2005) belegte Zusammenhang der Aktivierung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges mit der Steigerung der  $\alpha$ -SMA- und Col1 $\alpha$ -Synthese wurde in dieser Arbeit an pHSC untermauert.



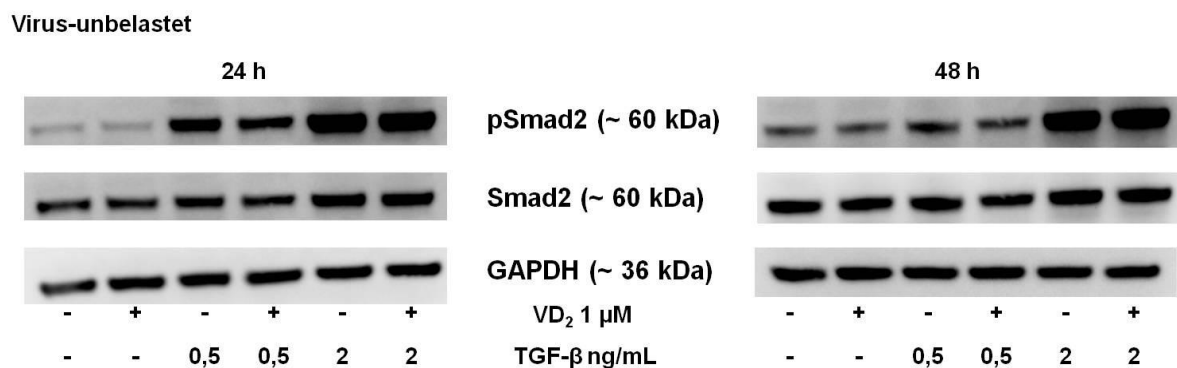
**Abbildung 37: Virus-abhängige Expression von pSmad2 und Smad2 in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von pSmad2 und Smad2 in Virus-unbelasteten (A, B), HBV- (C, D) und HCV-belasteten (E, F) pHSC aus n = 8 unabhängigen Experimenten, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur Zeit, berechnet mittels Student's *t*-Test, betrug  $p < 0,05$ . Die Gabe von VD<sub>2</sub> milderte die durch TGF- $\beta$  induzierte pSmad2-Expression marginal ab.



Im Gegensatz zu Abramovitch *et al.* (2011) stimulierte exogenes TGF- $\beta$  signifikant die VDR-Synthese in isolierten pHSC über die Aktivierung des Smad-Signalweges. Eine Vernetzung des TGF- $\beta$  mit dem Vitamin D konnte Takeshita *et al.* (1998) in Osteoblasten darstellen. Diese Ergebnisse und die in der vorliegenden Arbeit durch VD<sub>2</sub>-Behandlung beobachteten tendenziellen Abmilderungen der profibrotischen Genexpression führten zur Überprüfung des Smad-Signalweges anhand des Mediators Smad2.

Wie aus Abbildung 37 A, C, E zu entnehmen, wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Smad2-Phosphorylierung durch die pHSC-Behandlung mit TGF- $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufen. Ebenfalls stieg in allen untersuchten Gruppen durch die Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$  das Smad2-Gesamtprotein in seiner Expression an (Abbildung 37 B, D, F). Ausschließlich in der Gruppe der Virus-unbelasteten pHSC führte eine Behandlung der 0,5 ng/mL vorstimulierten Zellen mit VD<sub>2</sub> zu einer marginalen Reduktion der Phosphorylierung von Smad2 (Abbildung 37 A). Die signifikant inhibierende Wirkung von 1,25-VD auf die Phosphorylierung des Smad2 in TGF- $\beta$  stimulierten humanen Leiomyomzellen (Halder *et al.*, 2011) wurde in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC nicht gefunden.



**Abbildung 38: Detektion der Expressionen von pSmad2 und Smad2 in Virus-unbelasteten pHSC.**

Darstellung eines repräsentativen Western-Blots am Beispiel Virus-unbelasteter pHSC.

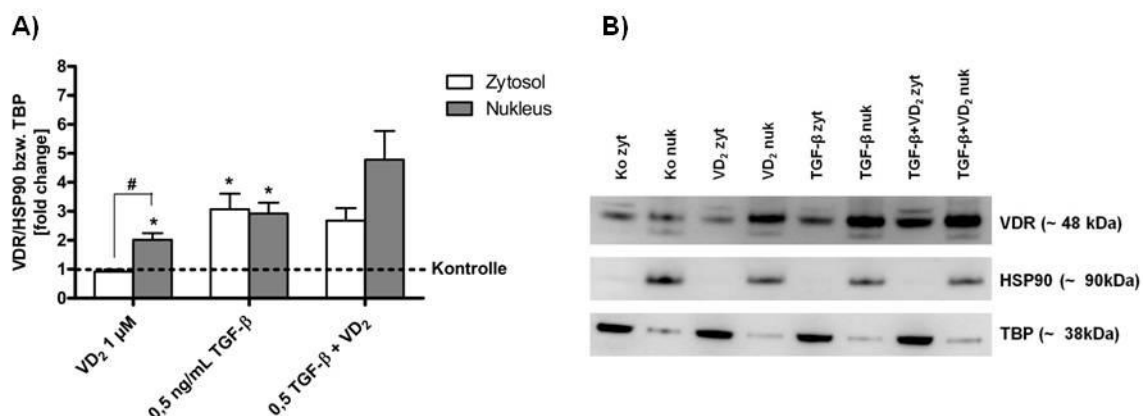
### 3.3.1.2 TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Wirkungen auf die zellkompartimentenabhängigen Expressionen von VDR und Smad-Mediatoren

Die Untersuchung der TGF- $\beta$ -vorstimulierten pHSC zeigte in allen Gruppen eine signifikante Steigerung der Expressionen des VDR und der profibrotischen Marker. Einzig in Virus-unbelasteten Zellen mit einer 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Vorstimulation wurde

durch die Behandlung mit VD<sub>2</sub> eine abgemilderte Genexpression von TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA und PDGF detektiert. Eine genauere Analyse der zellkompartimentenabhängigen Expression von VDR und pSmad-Mediatoren durch VD<sub>2</sub>-Behandlung sollte eine mögliche Beeinflussung auf die Lokalisation dieser Moleküle in der Zelle überprüfen.

Die beobachtete VD<sub>2</sub>-Wirkung in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten Virus-unbelasteten Zellen nach 24 h wurde verwendet, um in diesem Abschnitt die zytosolische und nukleäre Expression des VDR und von Smad-Mediatoren zu analysieren.

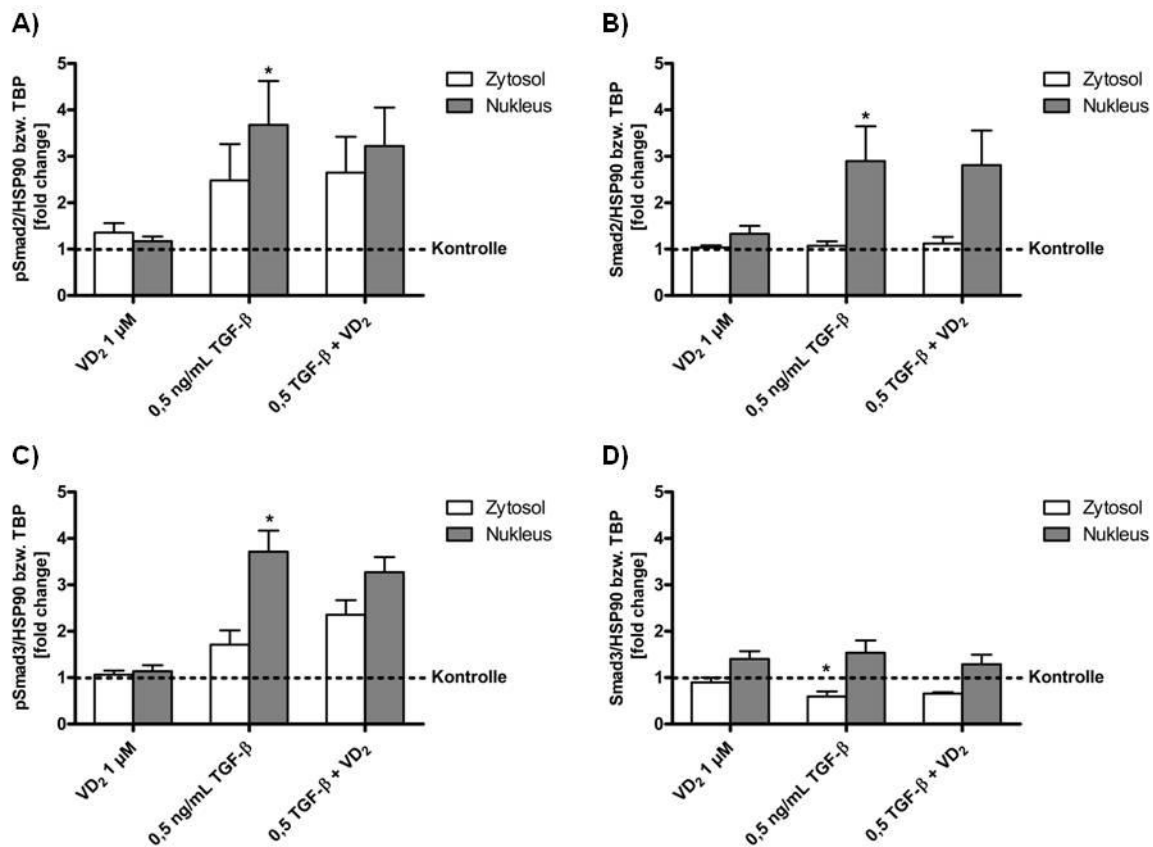
Der VDR wurde sowohl in der Gen- als auch in der Proteinexpression stark durch TGF- $\beta$  stimuliert, konnte jedoch durch die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> in seiner Expression nicht verändert werden. Eine durch VDR durchgeführte Induktion oder Repression von Zielgenen setzt die Bindung seines Liganden an den zytosolischen Rezeptor und der resultierende Translokation des Komplexes in den Nukleus voraus. Bei der Untersuchung der VDR-Proteinexpression in Abhängigkeit vom Zellkompartiment konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Behandlung der pHSC mit VD<sub>2</sub> für 24 h eine signifikant gesteigerte nukleäre Translokation des VDR verursacht wurde ( $p = 0,0023$ ) (Abbildung 39). Die zytosolische VDR-Proteinexpression wurde durch VD<sub>2</sub> im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst (Abbildung 39). Die Stimulation der Zellen mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  erzielte in beiden Kompartimenten eine signifikant erhöhte VDR-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle (Zytosol:  $p = 0,0014$ ; Nukleus:  $p = 0,0041$ ) (Abbildung 39). In den vorstimulierten pHSC verursachte eine zusätzliche Behandlung mit VD<sub>2</sub> einen tendenziellen Anstieg der nukleären VDR-Expression ( $p = 0,115$ ) (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Zellkompartiment-abhängige VDR-Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen VDR-Proteinexpression (A) im Zytosol und Nukleus der pHSC. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf HSP90 für Zytosol und TBP für Nukleus normalisiert. B) stellt ein repräsentatives Western Blot dar. VD<sub>2</sub>-Supplementation resultierte in gesteigerter VDR-Translokation.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass sowohl VD<sub>2</sub> als auch TGF-β eine gesteigerte nukleäre Translokation des VDRs verursachten.



**Abbildung 40: Zellkompartiment-abhängige Aktivierung des Smad-Signalweges in pHSC nach TGF-β- und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpression von pSmad2 (A), pSmad3 (C), Smad2 (B) und Smad3 (D) im Zytosol und im Nukleus der pHSC. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf HSP90 für Zytosol und TBP für Nukleus normalisiert. VD<sub>2</sub>-Supplementation resultierte in marginal verringerter pSmad3-Translokation.

Eine über den Smad-Signalweg hervorgerufene Induktion profibrotischer Gentranskriptionen setzte eine nukleäre Translokation der phosphorylierten Smad-Mediatoren (pSmad2 und pSmad3) voraus. Die in früheren Studien (Inagaki *et al.*, 2012; Matsuzaki *et al.*, 2012; Furukawa *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2005) beschriebenen nukleären Translokationen von pSmad3 und pSmad2 durch TGF-β konnten in der hier vorliegenden Dissertation bestätigt werden (Abbildung 40). Die Expressionen von pSmad2 und pSmad3 stiegen durch eine TGF-β-Stimulation im Zytosol tendenziell (pSmad2:  $p = 0,109$ ; pSmad3:  $p = 0,077$ ) und im Nukleus signifikant (pSmad2:  $p = 0,039$ ; pSmad3:  $p = 0,002$ ) im Vergleich zur Kontrolle an (Abbildung 40). Weder in TGF-β unstimulierten noch in TGF-β vorstimulierten pHSC bewirkte

VD<sub>2</sub> eine Änderung der Proteinexpression von pSmad2 und pSmad3 in beiden Zellkompartimenten (Abbildung 40). Jedoch zeigte sich in Anwesenheit von VD<sub>2</sub> eine marginal verringerte pSmad3-Translokation in den Nukleus (Abbildung 40 C).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass TGF- $\beta$  in pHSC seine Wirkung durch Aktivierung des Smad-Signalweg erzielte und VD<sub>2</sub> keinen ausgeprägten Einfluss auf den Aktivierungszustand hatte.

### **3.4 Einfluss von VDR in der Progression der Leberfibrose in TGF- $\beta$ behandelten primären humanen hepatischen Sternzellen**

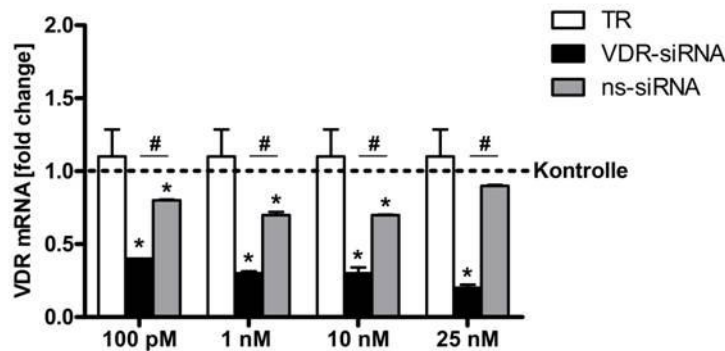
In den vorangegangenen Experimenten zeigte VD<sub>2</sub> ausschließlich geringe Wirkungen auf die profibrotische Genexpression, welche anscheinend durch eine nukleäre Translokation des VDR verursacht wurden. Interessanterweise wirkte TGF- $\beta$  stimulierend auf die VDR-Expression und nukleäre Translokation. Im Bezug auf die von Abramovitch *et al.* (2011) berichtete Reduktion der VDR-Expression während der HSC-Aktivierung wurde nachfolgend experimentell untersucht, ob eine reduzierte VDR-Expression sich auf die Expression profibrotischer Marker auswirkt. Eine Reduktion der zellulären VDR-Expression wurde mittels VDR-spezifischer siRNA erzielt.

#### **3.4.1 VDR-siRNA-Transfektion in humanen hepatischen Sternzellen**

Der mit der TGF- $\beta$ -Stimulation einhergehende Anstieg von VDR in pHSC könnte sich sowohl positiv als auch negativ auf den Progress der Fibrose und Entzündung auswirken. Um dies genauer zu analysieren, wurde die VDR-Expression mit Hilfe spezifischer siRNA in den isolierten pHSC blockiert.

#### **3.4.2 Optimierung des VDR-Knock-downs in kommerziellen humanen HSC mittels VDR-siRNA**

Die zu Beginn dieser *in vitro*-Experimente ermittelten Konzentrations/Wirkungs-Abhängigkeiten dienten der Ermittlung einer signifikanten Transfektionseffizienz. Die begrenzte Menge an isolierten pHSC erforderte die Optimierung des VDR-Knock-downs in khHSC. Hierzu wurde die Transfektionseffizienz unterschiedlicher Konzentrationen der VDR-siRNA und des Transfektionsreagens' Lipofectamin überprüft. Die Spezifität des VDR-Knock-downs wurde durch Verwendung unspezifischer siRNA nachgewiesen.

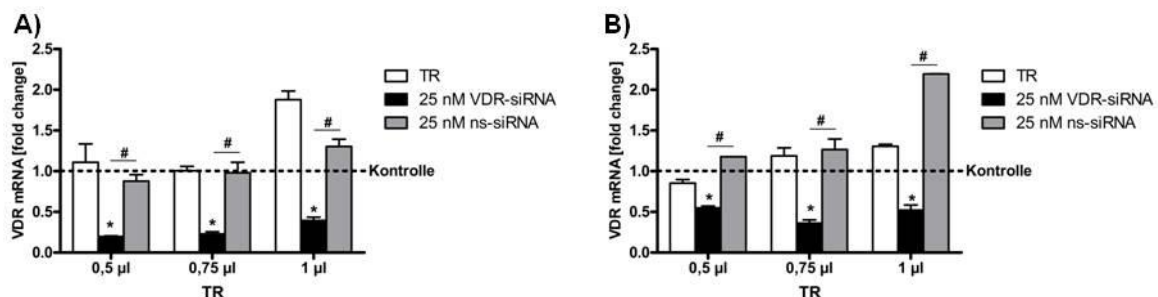


**Abbildung 41: Konzentrationsabhängige Reduktion der VDR-Genexpression in khHSC durch VDR-siRNA nach 24 h.**

Graphische Darstellung der relativen VDR-Genexpression in Abhängigkeit von der eingesetzten VDR-siRNA. Werte wurden als MW  $\pm$  SEM angegeben. Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur ns-siRNA betrug  $p < 0,05$ .

Im ersten Schritt wurde die empfohlene Menge von 0,5  $\mu$ L/Ansatz TR verwendet, um die Transfektionseffizienz der VDR-siRNA im Bereich von 100 pM bis 25 nM nach 24 h zu ermitteln. Durch Behandlung der Zellen mit unspezifischer siRNA bzw. mit TR wurde die Spezifität des VDR-Knock-downs überprüft. Wie Abbildung 41 zu entnehmen, bewirkte die verwendete VDR-siRNA über den gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich hinweg einen signifikanten Abfall der VDR-mRNA-Expression. Eine alleinige Behandlung der Zellen mit TR bewirkte nach 24 h keine Änderung der VDR-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle.

Im Vergleich der einzelnen Konzentrationen an VDR-siRNA und ns-siRNA zeigte sich, dass bei mit 25 nM siRNA die stärkste Verminderung von VDR und die beste Spezifität der Transfektion (gemessen anhand der ns-siRNA) nach 24 h erzielt wurde (Abbildung 41).



**Abbildung 42. VDR-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration an TR.**

Graphische Darstellung der relativen VDR-Genexpression in Abhängigkeit von der Konzentration des Transfektionsreagenz'. Werte wurden als MW  $\pm$  SEM angegeben. Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur ns-siRNA war  $p < 0,05$ .

Um eine eventuell stärkere Reduktionen der VDR-Genexpression durch die Optimierung des TR zu erzielen, wurden im Anschluss Experimente mit 25 nM VDR-siRNA und verschiedenen Volumina an TR (0,5  $\mu$ L, 0,75  $\mu$ L und 1  $\mu$ L) durchgeführt. Auch hier diente eine Behandlung der Zellen mit TR bzw. ns-siRNA als Spezifitätskontrolle. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte nach 24 h bzw. 48 h Inkubation. Eine TR-Menge von 0,5  $\mu$ L/Ansatz bewirkte keine konstante Reduktion der VDR-Genexpression über die Zeit (Abbildung 42). Die Verwendung von 1  $\mu$ L TR pro Ansatz beeinflusste in den Negativ-Kontrollen die VDR-mRNA-Expression (Abbildung 42). Eine signifikant VDR spezifische und konstante Reduktion konnte in Anwesenheit von 0,75  $\mu$ L TR/Ansatz bewirkt werden (Abbildung 42).

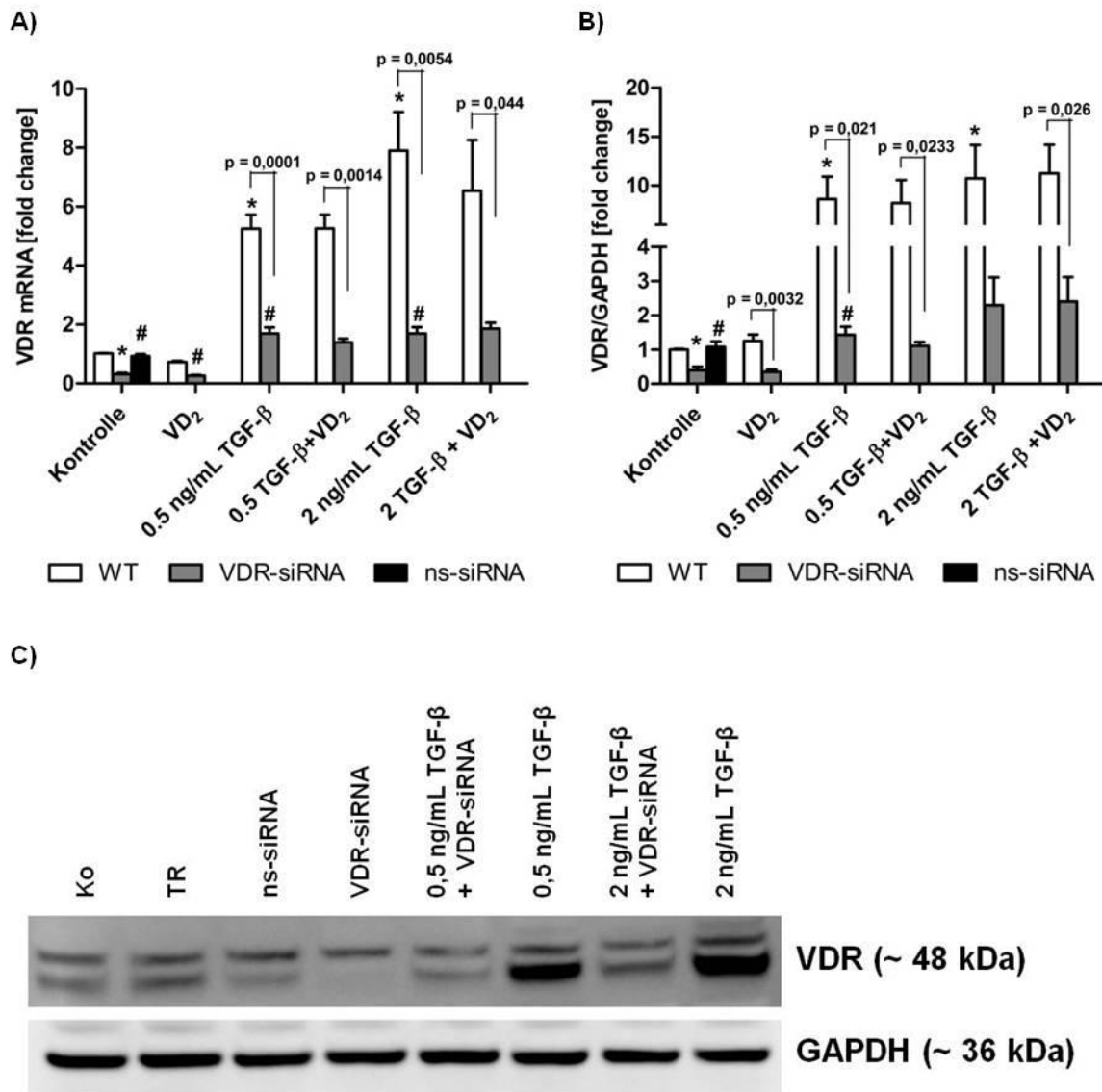
### **3.4.3 Expression von VDR und Fibrose-assoziiierter Moleküle nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> in pHSC mit siRNA abhängigem VDR-Knock-down**

Zur näheren Beurteilung einer Rolle des VDR in der Leberfibrose wurden nicht-transfizierte und mit VDR-siRNA-transfizierte pHSC für 24 h den gleichen Behandlungen mit TGF- $\beta$  (0,5 ng/mL und 2 ng/mL) und VD<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) unterzogen. Durch dieses experimentelle Design war ein direkter Vergleich der Expression des VDR sowie Fibrose-assoziiierter Moleküle möglich. In diesem Fall wurden ausschließlich Virus-unbelastete pHSC verwendet, um mögliche HBV- oder HCV-abhängige Effekte auszuschließen.

#### **3.4.3.1 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die VDR-Expression in pHSC**

Eine Transfektion der pHSC mit VDR-siRNA (25 nM) verursachte eine signifikante Inhibition der VDR-mRNA-Expression im Vergleich zur WT-Kontrolle (WT vs. VDR-siRNA:  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 43 A). Durch die Negativ-Kontrolle (ns-siRNA) konnte die Spezifität der Inhibition nachgewiesen werden (Abbildung 43 A). In den VDR-siRNA-transfizierten pHSC veränderte die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> die Genexpression nicht (Abbildung 43 A). Parallel hierzu wurde in WT-pHSC durch die Gabe von VD<sub>2</sub> eine signifikante Verringerung der VDR-mRNA-Expression verzeichnet (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p = 0,0022$ ). Unabhängig vom zellulären VDR-Spiegel stimulierte die Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$  (0,5 ng/mL und 2 ng/mL) die VDR-Genexpression signifikant (Abbildung 43 A). In den transfizierten Zellen wurde durch die TGF- $\beta$ -Behandlung die VDR-mRNA-Expression auf das 1,7-fache gesteigert (VDR-siRNA vs. VDR-siRNA + 5 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0028$ ; VDR-siRNA vs. VDR-siRNA + 2 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0015$ ) (Abbildung 43 A). Beide TGF- $\beta$ -Konzentrationen stimulierten

jedoch die VDR-Genexpression in VDR-siRNA-transfizierten Zellen weitaus geringer als in WT-phHSC (VDR-siRNA + 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0001$ ; VDR-siRNA + 2 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 2 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0054$ ) (Abbildung 43 A). Transfektionsunabhängig veränderte die Behandlung vorstimulierter phHSC mit VD<sub>2</sub> nach 24 h die VDR-mRNA-Expression nicht (Abbildung 43 A).



**Abbildung 43: VDR-Expression in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC.** Graphische Darstellung der relativen VDR-mRNA- (A) und Proteinexpressionen (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben sind. In C) wird ein repräsentatives Western Blot der Induktion der VDR-Expression in Abhängigkeit von der zellulären VDR-Konzentration gezeigt. Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . In Anwesenheit von VDR-siRNA blieb die VDR-Menge trotz TGF- $\beta$ -Stimulation reduziert.

Die in der VDR-Genexpression durch VDR-siRNA erzielte spezifische Transfektionseffizienz konnte auch in der Proteinmessung der VDR-Expression bestätigt werden

(Ko vs VDR-siRNA:  $p = 0,0012$ ) (Abbildung 43 B, C). Des Weiteren modulierte VD<sub>2</sub>-VDR-siRNA-transfektionsunabhängig die VDR-Proteinexpression weder in unstimulierten noch in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC (Abbildung 43 B). Beide exogene TGF- $\beta$ -Konzentrationen stimulierten signifikant in transfizierten sowie in WT-pHSC die VDR-Proteinsynthese in unterschiedlichem Maße (Abbildung 43 B, C). Während eine VDR-siRNA-Transfektion einen Anstieg um das 1,4- bis 2,3-fache erzielte, stieg die VDR-Expression in WT-pHSC um das 8,6- bis 10,7-fache im Vergleich zur Kontrolle an (Abbildung 43 B, C). Im direkten Vergleich der VDR-siRNA-transfizierter und WT-pHSC innerhalb der Behandlungsbedingung 0,5 bzw. 2 ng/mL TGF- $\beta$  bestätigten sich die ermittelten Differenzen in der Genexpression (VDR-siRNA + 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,02$ ; VDR-siRNA + 2 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 2 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,052$ ) (Abbildung 43 B, C).

Zusammenfassend konnten ein spezifischer und effizienter VDR-Knock-down sowie eine VD<sub>2</sub>-unabhängige und eine Knock-down-abhängige Induktion der VDR-Expression durch TGF- $\beta$  gezeigt werden.

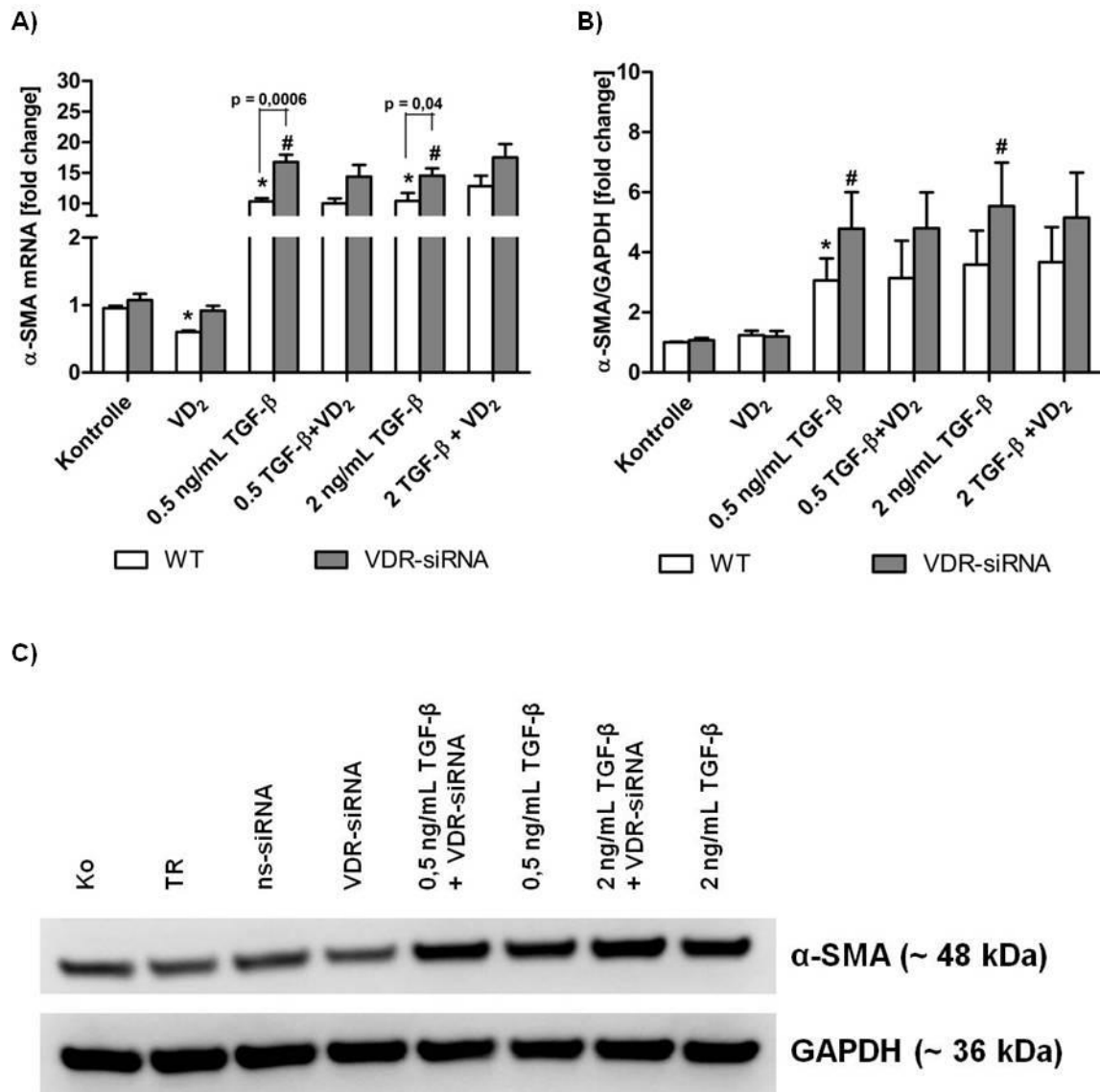
#### **3.4.3.2 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die $\alpha$ -SMA-Expression in pHSC**

Der durchgeführte VDR-Knock-down konnte durch Stimulation der pHSC mit TGF- $\beta$  nicht komplett antagonisiert werden. Die VDR-Expression war in den WT-pHSC nach TGF- $\beta$ -Stimulation signifikant höher als in mit VDR-siRNA-transfizierten Zellen. Somit konnte eine VDR-konzentrationsabhängige Expression Fibrose-relevanter Gene untersucht werden, wodurch eine Aussage über eine potenziell Fibrose-fördernde oder -inhibierende Wirkung des VDR möglich wurde.

Die mRNA-Expression des HSC-Aktivierungsmarkers  $\alpha$ -SMA wurde durch die VDR-siRNA-Transfektion der pHSC im Vergleich zur unbehandelten WT-Kontrolle nicht verändert (Abbildung 44 A). Während in diesen transfizierten Zellen die Behandlung mit VD<sub>2</sub> keine Änderung der Genexpression von  $\alpha$ -SMA erzielte, wurde in den WT-pHSC unter den durchgeführten Kultivierungsbedingungen durch VD<sub>2</sub> eine signifikant reduzierte  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression (Ko vs. VD<sub>2</sub>:  $p < 0,0001$ ) nachgewiesen (Abbildung 44 A). Sowohl in VDR-siRNA-transfizierten Zellen als auch in WT-pHSC induzierte eine Stimulation mit exogenem TGF- $\beta$  eine signifikante  $\alpha$ -SMA-Genexpressionserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 44 A). Interessanterweise bewirkte eine verminderte VDR-Zellkonzentration in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC einen signifikant stärkeren  $\alpha$ -SMA-Expressionsanstieg als



unter den gleichen Bedingungen in WT-phHSC (VDR-siRNA + 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0006$ ; VDR-siRNA + 2 ng/mL TGF- $\beta$  vs. 2 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,0397$  (Abbildung 44 A). Die Gabe von VD<sub>2</sub> konnte in beiden untersuchten phHSC-Gruppen die durch TGF- $\beta$ -Vorstimulation veränderte Expression nicht beeinflussen (Abbildung 44 A).



**Abbildung 44:  $\alpha$ -SMA-Expression in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC.**

Graphische Darstellung der relativen  $\alpha$ -SMA-mRNA- (A) und Proteinexpressionen (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben sind. In C) wird ein repräsentatives Western Blot der Induktion der  $\alpha$ -SMA-Expression in Abhängigkeit von der zellulären VDR-Konzentration gezeigt. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR siRNA betrug  $p < 0,05$ . Eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration resultierte in erhöhter  $\alpha$ -SMA-Expression.

Ohne einen profibrotischen Reiz blieb die  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression in VDR-siRNA-transfizierten pHSC unauffällig (Abbildung 44 B, C). Im Gegensatz zur Genexpression bewirkte VD<sub>2</sub> VDR-siRNA-transfektionsunabhängig keine Änderung in der Expression von  $\alpha$ -SMA im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 44 B). Exogenes TGF- $\beta$  führte in beiden untersuchten pHSC-Gruppen zu einer signifikanten Induktion der Proteinsynthese (Abbildung 44 B, C). Während in WT-pHSC eine ca. dreifach gesteigerte Proteinsynthese detektiert wurde, zeigten VDR-siRNA-transfizierte pHSC eine ca. verfünffachte Aktivierung von  $\alpha$ -SMA (Abbildung 44 B, C). Die hervorgerufenen Induktionen der Proteinsynthese wurden durch VD<sub>2</sub> nicht moduliert (Abbildung 44 B).

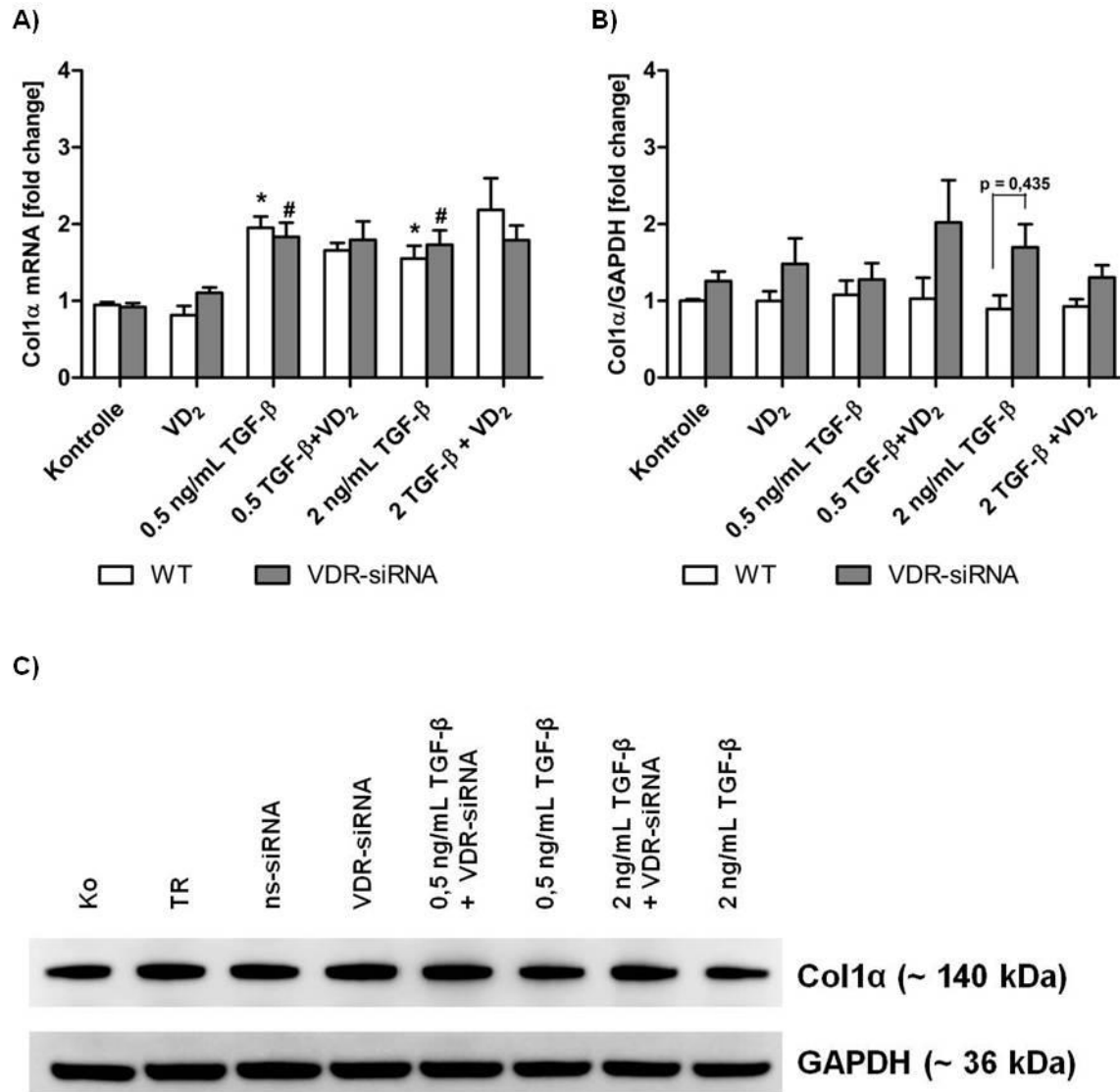
Zusammenfassend konnte eine VDR-konzentrationsabhängige Induktion der Expression von  $\alpha$ -SMA nach TGF- $\beta$ -Stimulation nachgewiesen werden.

#### **3.4.3.3 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die Col1 $\alpha$ -Expression in pHSC**

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem mit der Leberfibrose einhergehenden exzessiven Anstieg extrazellulärer Matrixproteine (Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2011) und die mit der HSC-Aktivierung einhergehende Reduktion der VDR-Expression (Abramovitch *et al.*, 2011) wurden mittels VDR-siRNA-Transfektion überprüft. Die in den pHSC durchgeführte VDR-siRNA-Transfektion führte zu keiner Änderung der Col1 $\alpha$ -Genexpression im Vergleich zur WT-Kontrolle (Abbildung 45 A). Eine Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> hatte weder in VDR-siRNA-transfizierten noch in WT-pHSC einen Einfluss auf die Col1 $\alpha$ -Genexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 45 A). Interessanterweise zeigten WT-pHSC eine tendenziell geringere Col1 $\alpha$ -Genexpression als VDR-siRNA-transfizierte pHSC ( $p = 0,072$ ) nach 24-stündiger VD<sub>2</sub>-Inkubation (Abbildung 45 A). Unabhängig von der TGF- $\beta$ -Konzentration und der VDR-siRNA-Transfektion verursachte die Gabe von exogenem TGF- $\beta$  eine signifikante Steigerung der Col1 $\alpha$ -Genexpression (Abbildung 45 A). Die Supplementation von VD<sub>2</sub> erzielte in den TGF- $\beta$ -vorstimulierten pHSC keine Änderung der Expression von Col1 $\alpha$  (Abbildung 45 A).

Eine Transfektion der pHSC mit VDR-siRNA resultierte in einer marginal höheren Col1 $\alpha$ -Proteinexpression im Vergleich zur WT-Kontrolle (Abbildung 45 B, C). Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle rief eine Behandlung der pHSC mit VD<sub>2</sub> keine Änderung der Proteinexpression von Col1 $\alpha$  hervor (Abbildung 45 B). In WT-pHSC wurde eine annähernd gleiche Expression von Col1 $\alpha$  durch die Behandlungen mit

0,5 ng/mL bzw. 2 ng/mL exogenem TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub> im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 45 B, C). In den pHSC mit VDR-siRNA-Knock-down erzielte eine Behandlung mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  keine und eine Behandlung mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  nur eine geringfügig höhere Col1 $\alpha$ -Proteinexpression als in der VDR-siRNA-Kontrolle (Abbildung 45 B, C).



**Abbildung 45: VDR-siRNA-transfektionsabhängige Col1 $\alpha$ -Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Col1 $\alpha$ -mRNA- (A) und Proteinexpressionen (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben sind. In C) wird ein repräsentatives Western Blot der Induktion der Col1 $\alpha$ -Expression in Abhängigkeit von der zellulären VDR-Konzentration gezeigt. Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR siRNA betrug  $p < 0,05$ . Eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration resultierte in einer stärkeren Col1 $\alpha$ -Expression.

Eine Supplementation mit VD<sub>2</sub> beeinflusste die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression in 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -vorstimulierten pHSC nicht (Abbildung 45 B). In mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC wurde durch die Gabe von VD<sub>2</sub> nach 24-stündiger Inkubation nur eine marginal verminderte Proteinexpression detektiert. Wie Abbildung 45 zu entnehmen ist, resultierte eine Stimulation der Zellen mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  in einer signifikant höheren Col1 $\alpha$ -Expression in VDR-siRNA-transfizierten Zellen als in WT pHSC ( $p = 0,044$ ).

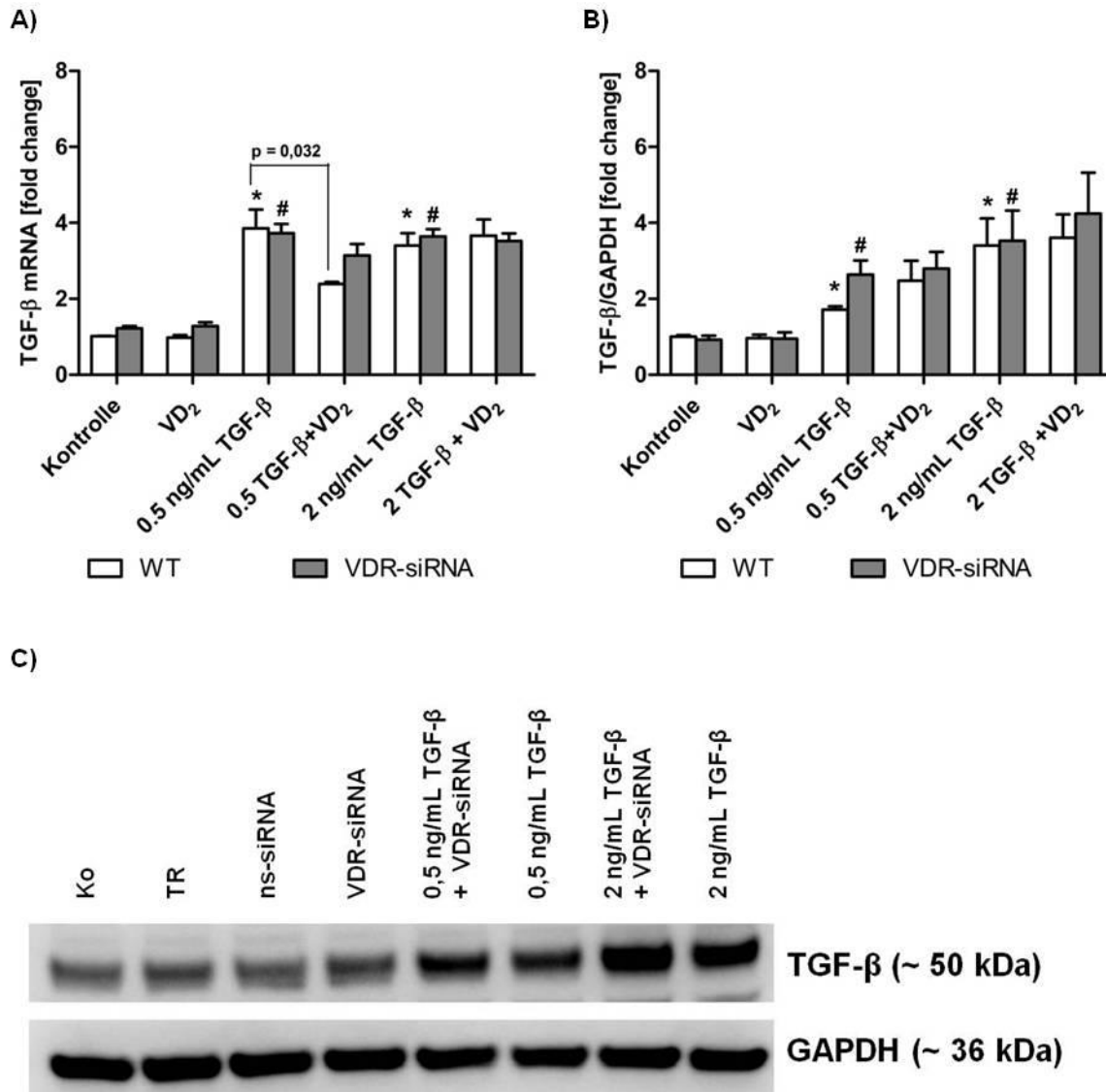
Zusammengefasst ließ sich zeigen, dass die zelluläre VDR-Konzentration einen Einfluss auf die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression ausübte.

#### **3.4.3.4 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die TGF- $\beta$ -Expression in pHSC**

Durch den erfolgreichen VDR-Knock-down in isolierten pHSC konnte die TGF- $\beta$ -Synthese hinsichtlich der VDR-Zellkonzentration in den Zellen untersucht werden. Das potenteste Fibrose-stimulierende Zytokin TGF- $\beta$  zeigte im Vergleich zur WT-Kontrolle durch die VDR-siRNA-Transfektion eine marginal höhere Genexpression von TGF- $\beta$  (Abbildung 46 A). In unstimulierten pHSC wurde VDR-transfektionsunabhängig durch die Behandlung mit VD<sub>2</sub> die TGF- $\beta$ -Genexpressionsintensität gegenüber der jeweiligen Kontrolle nicht verändert (Abbildung 46 A). Sowohl in VDR-siRNA-transfizierten als auch in WT-pHSC resultierte eine exogene (0,5 bzw. 2 ng/mL) TGF- $\beta$ -Stimulation in einer ca. 3,6-fach gesteigerten TGF- $\beta$ -mRNA-Expression (Abbildung 46 A). Dieser Anstieg konnte ausschließlich unter den verwendeten Bedingungen in 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -vorstimulierten WT-pHSC durch eine VD<sub>2</sub>-Supplementation ( $p = 0,0319$ ) antagonisiert werden (Abbildung 46 A). Somit wurde im Vergleich mit den VDR-siRNA-pHSC unter dieser Bedingung ebenfalls eine deutlich verminderte TGF- $\beta$ -Genexpression ( $p = 0,0567$ ) beobachtet (Abbildung 46 A).

Die in der Genexpression marginal erhöhte TGF- $\beta$ -mRNA in VDR-siRNA-transfizierten Zellen wurde auf Proteinebene nicht nachgewiesen (Abbildung 46 B, C). In nicht Fibrose-stimulierten pHSC bewirkte die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> keine Änderung der Proteinexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 46 B). Obwohl eine Stimulation mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  VDR-siRNA-transfektionsunabhängig einen signifikanten Anstieg von endogenem TGF- $\beta$  zeigte, wurde auf Proteinebene in pHSC mit VDR-Knock-down eine deutlich höhere TGF- $\beta$ -Expression erzielt, als in den WT-pHSC ( $p = 0,095$ ) (Abbildung 46 B, C). Des Weiteren wurde in den WT-pHSC ein TGF- $\beta$ -konzentrationsabhängiger Anstieg des

TGF- $\beta$ -Proteins gefunden (Abbildung 46 B, C). Im Gegensatz dazu wurden in VDR-siRNA-transfizierten Zellen durch Stimulation mit exogenem TGF- $\beta$  annähernd gleiche Expressionssteigerungen beobachtet (Abbildung 46 B, C). Die in der Genexpression durch eine Supplementation mit VD<sub>2</sub> detektierte Reduktion der TGF- $\beta$ -mRNA bei mit 0,5 ng/ml TGF- $\beta$  vorstimulierten WT-phHSC konnte auf Proteinebene nicht untermauert werden: Behandlung der vorstimulierten Zellen mit VD<sub>2</sub> erzielte keine positiven Effekte (Abbildung 46 B).



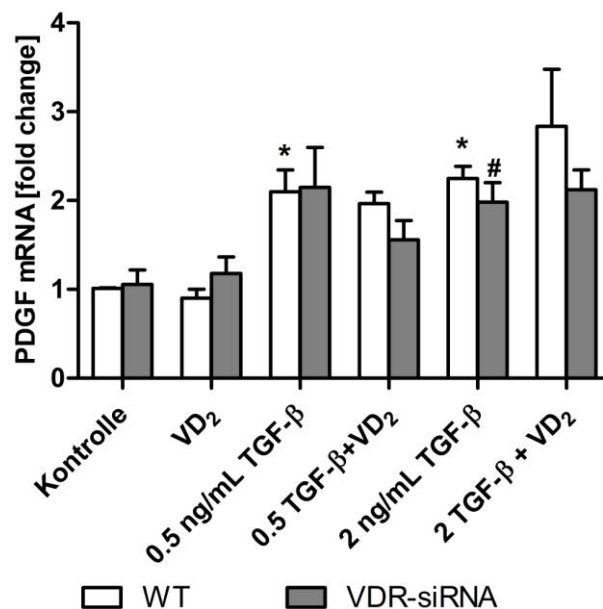
**Abbildung 46: VDR-siRNA-transfektionsabhängige TGF- $\beta$ -Expression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen TGF- $\beta$ -mRNA- (A) und Proteinexpressionen (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (angaben als MW  $\pm$  SEM). C) stellt ein repräsentatives Western Blot der Induktion der TGF- $\beta$ -Expression in Abhängigkeit von der zellulären VDR-Konzentration dar. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . Eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration resultierte in einer stärkeren TGF- $\beta$ -Expression nach 0,5 ng/mL exogener TGF- $\beta$ -Gabe.

Zusammengefasst wurde verifiziert, dass bei geringer profibrotischen Stimulation eine Reduktion der zellulären VDR-Konzentration mit einer erhöhten TGF- $\beta$ -Proteinexpression einher ging. Zusätzlich konnte auf Genexpressionsebene beobachtet werden, dass in 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration eine Reduktion der TGF- $\beta$ -mRNA nach VD<sub>2</sub>-Supplementation verhinderte.

### 3.4.3.5 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die PDGF-Genexpression in pHSC

Sowohl das HSC-Mitogen PDGF als auch das ECM-Protein FN wurden aufgrund limitierter Zellisolationausbeute und der definierten Passagemöglichkeiten ausschließlich hinsichtlich ihrer Genexpressionen untersucht.



**Abbildung 47: VDR-siRNA-transfektionsabhängige PDGF-Genexpression in pHSC nach TGF- $\beta$ - und/oder VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen PDGF-mRNA-Expressionen in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC, welche als MW  $\pm$  SEM angegeben sind. Das Signifikanzniveau (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . Eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration beeinflusste die PDGF-Expression nicht.

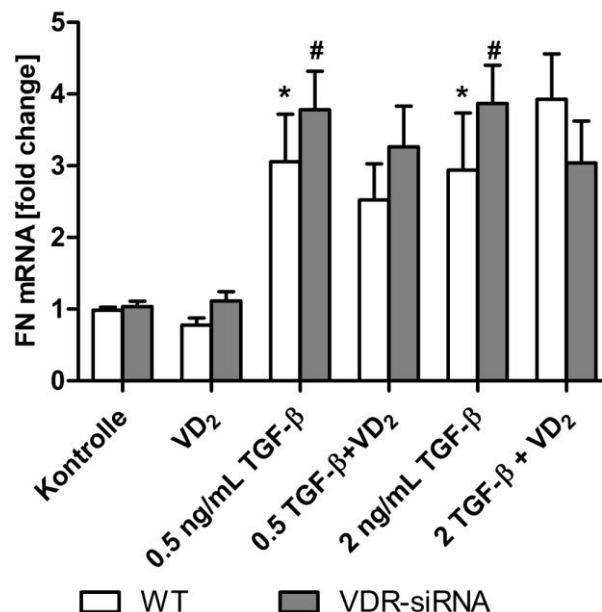
In dieser Untersuchung war zu überprüfen, ob eine reduzierte VDR-Expression die PDGF-Synthese beeinflusst. Der VDR-Knock-down bewirkte ohne einen fibrotischen Reiz keine Änderung der PDGF-mRNA-Expression im Vergleich zur WT-Kontrolle (Abbildung 47). In beiden untersuchten pHSC-Gruppen konnte durch eine Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> keine Modulation der PDGF-Genexpression im Vergleich zur

jeweiligen Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 47). Dennoch wiesen WT-phHSC durch eine VD<sub>2</sub>-Behandlung eine marginal geringere PDGF-mRNA-Expression auf als die VDR-siRNA-transfizierten phHSC (Abbildung 47). Eine Stimulation der Zellen mit 0,5 bzw. 2 ng/mL TGF- $\beta$  resultierte in einer ca. 2-fach gesteigerten PDGF-mRNA-Expression unabhängig der VDR-Transfektion (Abbildung 47). Eine Behandlung der mit TGF- $\beta$  vorstimulierten Zellen mit VD<sub>2</sub> bewirkte weder in transfizierten noch in untransfizierten phHSC signifikant veränderte PDGF-Expressionen (Abbildung 47).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass VD<sub>2</sub> und VDR keinen Einfluss auf die PDGF-Genexpression hatten.

### 3.4.3.6 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ auf die FN-Genexpression in phHSC

Eine protektive Wirkung von FN in der Leberfibrose wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen (Kawelke *et al.*, 2011). Die schon mehrfach beschriebene Synthesesteigerung von FN durch TGF- $\beta$  (Friedman *et al.*, 2008a; Tsukada *et al.*, 2006) sollte in dieser Untersuchung in Abhängigkeit von VDR analysiert werden.



**Abbildung 48: VDR-siRNA-transfektionsabhängige FN-Genexpression in phHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen FN-mRNA-Expressionen in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC (Angaben als MW  $\pm$  SEM). Das Signifikanzniveau (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . Eine verminderte zelluläre VDR-Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die FN-Expression.

Eine Transfektion isolierter pHSC mit VDR-siRNA hatte keine Änderung der FN-Genexpression zur Folge (Abbildung 48). Während eine VD<sub>2</sub>-Behandlung unstimulierter VDR-siRNA-transfizierter pHSC die FN-mRNA-Expression im Vergleich zur VDR-siRNA-Kontrolle nicht veränderte, wurde in den WT-pHSC eine tendenzielle Reduktion ( $p = 0,083$ ) der FN-Genexpression gemessen (Abbildung 48). Im Vergleich der untersuchten pHSC unter VD<sub>2</sub>-Behandlung konnte somit ein geringerer FN-Expressionsgrad in WT-pHSC ( $p = 0,068$ ) beobachtet werden (Abbildung 48). Durch Stimulation der Zellen mit exogenem TGF- $\beta$  wurde eine TGF- $\beta$ -konzentrationsunabhängige, aber VDR-siRNA-abhängige, signifikante Steigerung der FN-Synthese beobachtet (Abbildung 48). Während in Zellen mit VDR-Knock-down ein Anstieg auf das ca. 3,8-fache verzeichnet wurde, stieg die Genexpression in WT-pHSC um das 3-fache an (Abbildung 48). Eine Supplementation von VD<sub>2</sub> in TGF- $\beta$  vorstimulierten Zellen bewirkte keine signifikante Änderung der FN-mRNA-Expression (Abbildung 48).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass eine TGF- $\beta$ -Stimulation VDR-siRNA-transfektionsabhängig die FN-Genexpression steigert.

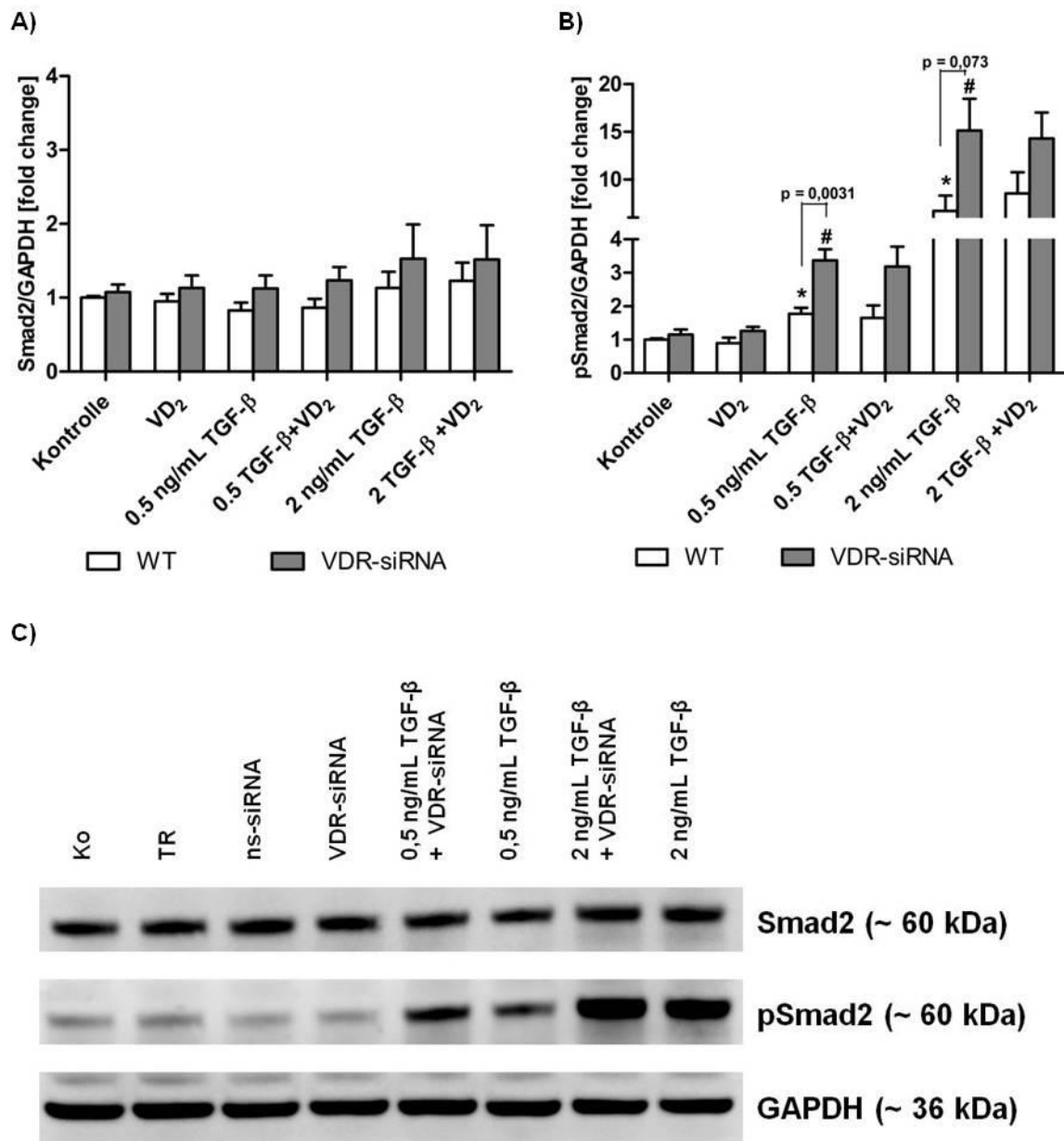
#### **3.4.4 VDR-siRNA-transfektionsabhängige Wirkungen von VD<sub>2</sub> und VDR auf die Expression Smad-Signalweg-abhängiger Mediatoren sowie des Erk-Signalmoleküls in pHSC**

Mit Hilfe des VDR-Knock-downs konnte eine förderliche Wirkung auf das Fortschreiten der Leberfibrose nachgewiesen werden. Eine reduzierte VDR-Expression bewirkte eine Zunahme Fibrose-relevanter Marker wie TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$  und FN. Durch Einsatz eines TGF- $\beta$ -Rezeptorantagonisten wurde nachgewiesen, dass die Expressionen von VDR,  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  durch Aktivierung des Smad-Signalweges gesteigert wurden. Somit war es in diesem Abschnitt von Interesse, einen möglichen Einfluss des VDR auf den Smad-Signalweg zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden der Smad-Signalwegsmediator Smad2 sowie die Smad-Signalwegsinhibitoren „*SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2*“ (Smurf2) und Smad7 untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse des ERK-Signalweges, da frühere Studien eine Aktivierung dieses Weges durch TGF- $\beta$  mit nachfolgender Aktivierung des Smad-Signalweges und Col1 $\alpha$ -Synthesesteigerung gezeigt hatten (Matsuzaki *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010).

Zur Überprüfung der Aktivierung des Smad-Signalweges diente in dieser Arbeit die Analyse des Phosphorylierungsstatus' von Smad2. Weder in VDR-siRNA-transfizierten



noch in WT-phHSC wurde die Expression des Smad2-Mediators durch Gabe von exogenem TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub> verändert. (Abbildung 49 A)



**Abbildung 49: VDR-siRNA-transfektionsabhängige Expression der Mediatoren Smad2 und pSmad2 in phHSC nach TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

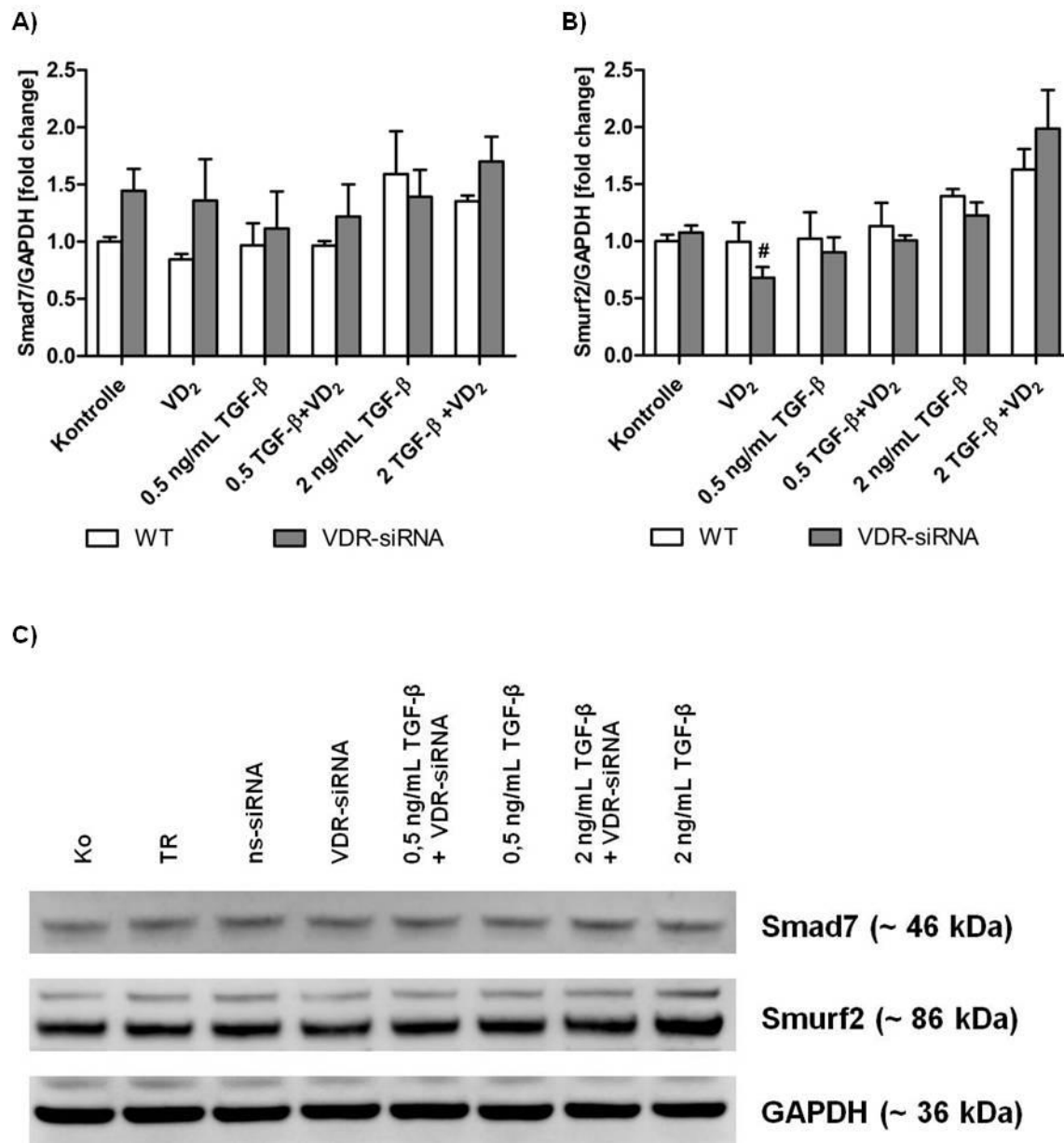
Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad2 (A) und pSmad2 (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten phHSC (Angaben als MW  $\pm$  SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western-Blots. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA-Gruppe betrugen p < 0,05. Eine reduzierte zelluläre VDR-Konzentration begünstigte die Aktivierung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges.

Im Gegensatz zum Smad2-Mediator zeigte die Aktivierung des Smad-Signalweges anhand des phosphorylierten Smad2-Proteins einige Veränderungen: Während eine

Behandlung der untersuchten Zellen mit  $VD_2$  keine Änderung der pSmad2-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle aufwies, bewirkte exogene TGF- $\beta$ -Stimulation sowohl in VDR-transfizierten als auch nicht-transfizierten pHSC eine TGF- $\beta$ -konzentrationsabhängige Steigerung der pSmad2-Proteinexpression (Abbildung 49 B, C). Ausschlaggebend für eine deutlich höhere Expressionsintensität von pSmad2 durch eine exogene TGF- $\beta$ -Stimulation war der VDR-Knock-down (0,5 ng/mL:  $p = 0,0031$ ; 2 ng/mL TGF- $\beta$ :  $p = 0,073$ ) (Abbildung 49 B, C). VDR-siRNA-transfektionsunabhängig verursachte die Supplementation von  $VD_2$  in vorstimulierten pHSC keine signifikante Änderung des pSmad2-Aktivierungsstatus' (Abbildung 49 B).

Anhand dieser Ergebnisse konnten die beobachteten unterschiedlichen Expressionen Fibrose-relevanter Proteine zwischen VDR-siRNA- und WT-pHSC nach exogener TGF- $\beta$ -Stimulation auf eine VDR-abhängige Modulation des Smad-Signalweges zurückgeführt werden. Zur näheren Beurteilung der Rolle von VDR in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC auf die Aktivierung des Smad-Signalweges wurde daraufhin die Expression der Smad-Signalwegskomponenten Smad7 und Smurf2 untersucht. Smad7 und Smurf2 komplexieren mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor, wodurch die Phosphorylierung der Mediatoren Smad2 und Smad3 inhibiert wird.

Interessanterweise bewirkte eine VDR-siRNA-Transfektion in pHSC einen tendenziellen Anstieg des Inhibitors Smad7 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 50 A, C). Keine der durchgeführten Behandlungen mit TGF- $\beta$  und/oder  $VD_2$  erzielten eine Steigerung der Expression von Smad7 im Vergleich zur unbehandelten VDR-siRNA-Kontrolle (Abbildung 50 A). Behandlungen dieser Zellen sowohl mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  und/oder  $VD_2$  als auch mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  führten zu einer ca. 0,5-fach reduzierten Smad7-Expression (Abbildung 50 A, C). Lediglich durch die Supplementation von  $VD_2$  in mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC konnte das Kontrollniveau wieder erreicht werden (Abbildung 50 A). Wie auch in den transfizierten Zellen erzielte eine Behandlung der WT-pHSC mit  $VD_2$  eine Reduktion der Smad7-Expression ( $p = 0,056$ ). Inkubationen der Zellen mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  und/oder  $VD_2$  veränderten die Expression von Smad7 im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abbildung 50 A). Eine stärkere Stimulation der Zellen mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  steigerte sogar geringfügig die Smad7-Expression im Vergleich zur Kontrolle, welche durch zusätzliche  $VD_2$ -Gabe nicht beeinflusst wurde (Abbildung 50 A).



**Abbildung 50: VDR-siRNA-transfectionsabhängige Expression von Smad7 und Smurf2 in pHSC nach TGF-β- und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad7 (A) und Smurf2 (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (Angaben als MW ± SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western Blots. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betragen  $p < 0,05$ . Die durch eine reduzierte zelluläre VDR-Konzentration begünstigte Aktivierung des TGF-β/Smad-Signalweges konnte nicht durch die Steigerung der Smad-Inhibitoren erklärt werden.

Smurf2 steigert durch die Bindung an die Komponente Smad7 dessen inhibitorischen Effekt auf den Smad-Signalweg. Hier konnte durch eine VDR-siRNA-Transfektion der Zellen keine veränderte Smurf2-Expression beobachtet werden (Abbildung 50 B, C). In unstimulierten transfizierten pHSC verursachte eine 24-stündige Inkubation mit

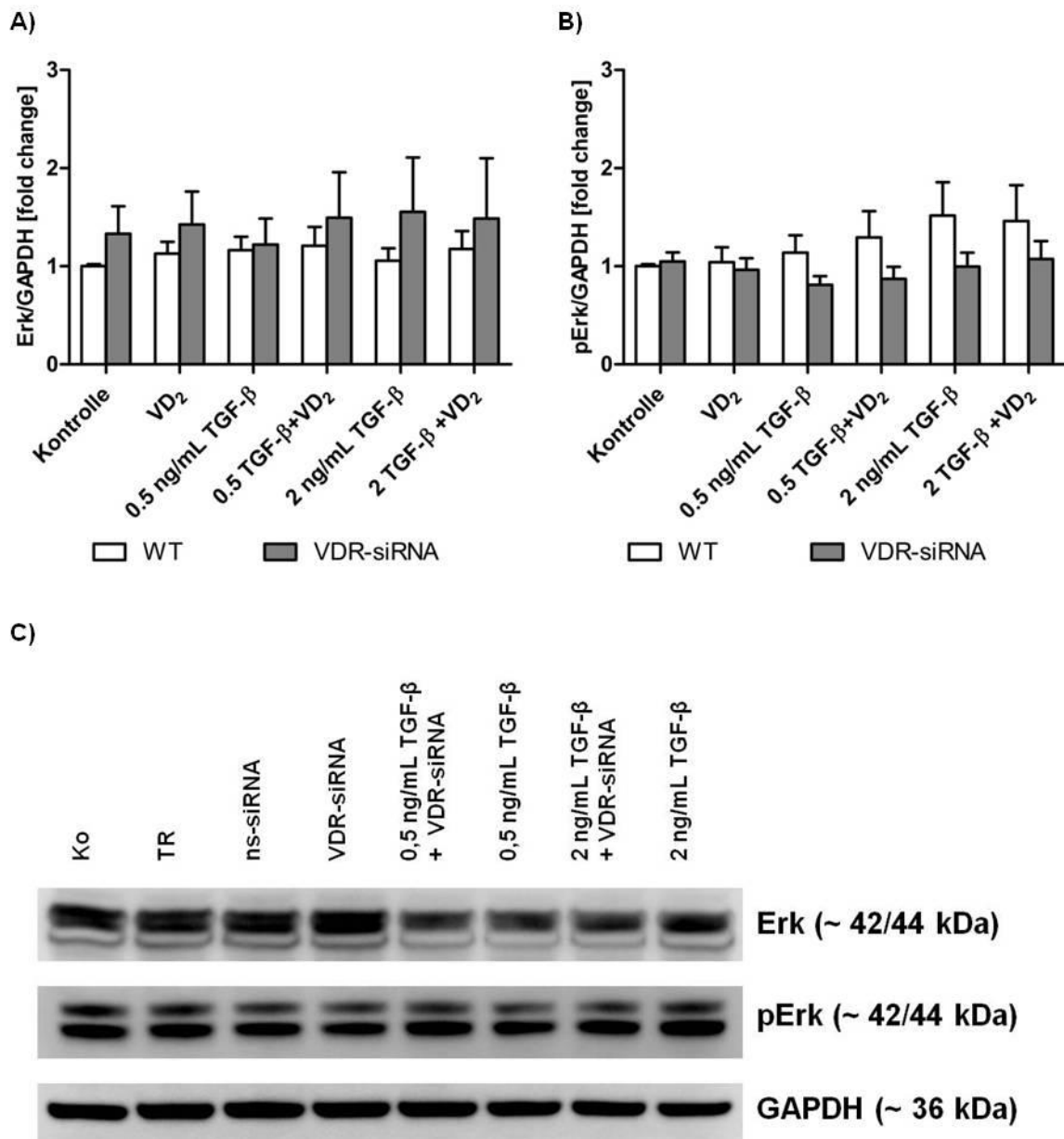
VD<sub>2</sub> eine signifikante Reduktion der Smurf2-Expression im Vergleich zur VDR-siRNA-transfizierten Kontrolle (Abbildung 50 B). Eine Stimulation dieser Zellen mit exogenem TGF- $\beta$  verursachte keine Änderung der Smurf2-Expression im Vergleich zur transfizierten Kontrolle (Abbildung 50 B, C). Lediglich die Supplementation von VD<sub>2</sub> in 2 ng/mL TGF- $\beta$  induzierte eine gesteigerte Smurf2-Expression (Abbildung 50 B, C). Die in den WT-phHSC nicht verringerte VDR-Expression veränderte die Smurf2-Expression durch die Behandlungen mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub> im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abbildung 50 B). Eine Stimulation der Zellen mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  verursachte einen Anstieg der Smurf2-Expression (Abbildung 50 B, C). In diesen vorstimulierten Zellen veränderte eine Supplementation mit VD<sub>2</sub> die Expression nicht (Abbildung 50 B).

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine reduzierte zelluläre VDR-Expression deutlich die Aktivierung des Smad-Signalweges – dargestellt durch den Smad2-Mediator – begünstigt, wobei diese nicht eindeutig auf die Hemmung der Inhibitoren Smad7 und Smurf2 zurückgeführt werden konnte.

Das Zytokin TGF- $\beta$  besitzt die Fähigkeit, neben dem Smad-Signalweg auch andere Signalwege, wie etwa den Erk-Signalweg, zu aktivieren (Schnabl *et al.*, 2001). Frühere Studien zeigten, dass die Aktivierung des Erk-Signalweges zu einer Induktion des Smad-Signalweges führt und somit die ECM-Synthese stimuliert (Matsuzaki *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). Da kein VDR-abhängiger Einfluss auf die Expression der Smad-Signalwegsinhibitoren nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob VDR die Phosphorylierung von Smad2 über die Modulation des Erk-Signalweges beeinflusst.

Weder in den WT- noch den VDR-siRNA-phHSC hatten TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub> eine signifikante Wirkung auf die Expression von pErk und Erk (Abbildung 51). Die Gabe von TGF- $\beta$  induzierte unter diesen Bedingungen den Erk-Signalweg nicht (Abbildung 51). Die beobachtete stärkere Induktion des Smad-Signalweges bei reduzierter VDR-Expression wurde nicht durch eine Aktivierung des Erk-Signalweges verursacht (Abbildung 51). Im Vergleich mit WT-phHSC zeigte sich in den VDR-siRNA-transfizierten Zellen eine geringere pErk-Expression (Abbildung 51).

Somit hatte die Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$  und/oder VD<sub>2</sub> keinen Einfluss auf die Induktion des Erk-Signalweges.



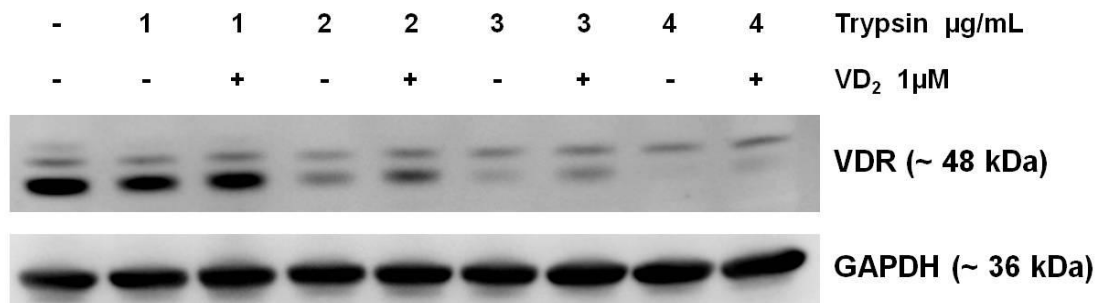
**Abbildung 51: VDR-siRNA-transfectionsabhängige Expression von Erk und pErk in pHSC nach TGF-β- und VD<sub>2</sub>-Behandlung.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Erk (A) und p-Erk (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (Angaben als MW ± SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western Blots. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . Der Erk-Signalweg blieb durch die Behandlungen unbeeinflusst.

### 3.5 VDR-Degradation in Abhängigkeit von VD<sub>2</sub> in pHSC

Während in den *ex vivo*-Daten eine Assoziation von VD-Mangel und reduziertem VDR-Gesamtlängen-Protein mit der NAFLD zu beobachten war, wurde *in vitro* nach exogener TGF-β-Stimulation trotz Aktivierung Fibrose-relevanter Markern keine VDR-Reduktion nachgewiesen. Unter der TGF-β vermittelten Erhöhung von VDR

erzielte eine VD<sub>2</sub>-Supplementation vorwiegend Wirkungen auf Genexpressions-ebene. Der *ex vivo* detektierte VDR-Mangel konnte *in vitro* mittels VDR-siRNA-Transfektion imitiert werden, wodurch ein ausgeprägter Anstieg der untersuchten Fibrosemarker erfolgte.



#### Abbildung 52: VDR-Degradation in pHSC.

Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der VDR-Degradation mittels Trypsin in Abhängigkeit von VD<sub>2</sub>. Eine VD<sub>2</sub>-Supplementation milderte die VDR-Degradation ab.

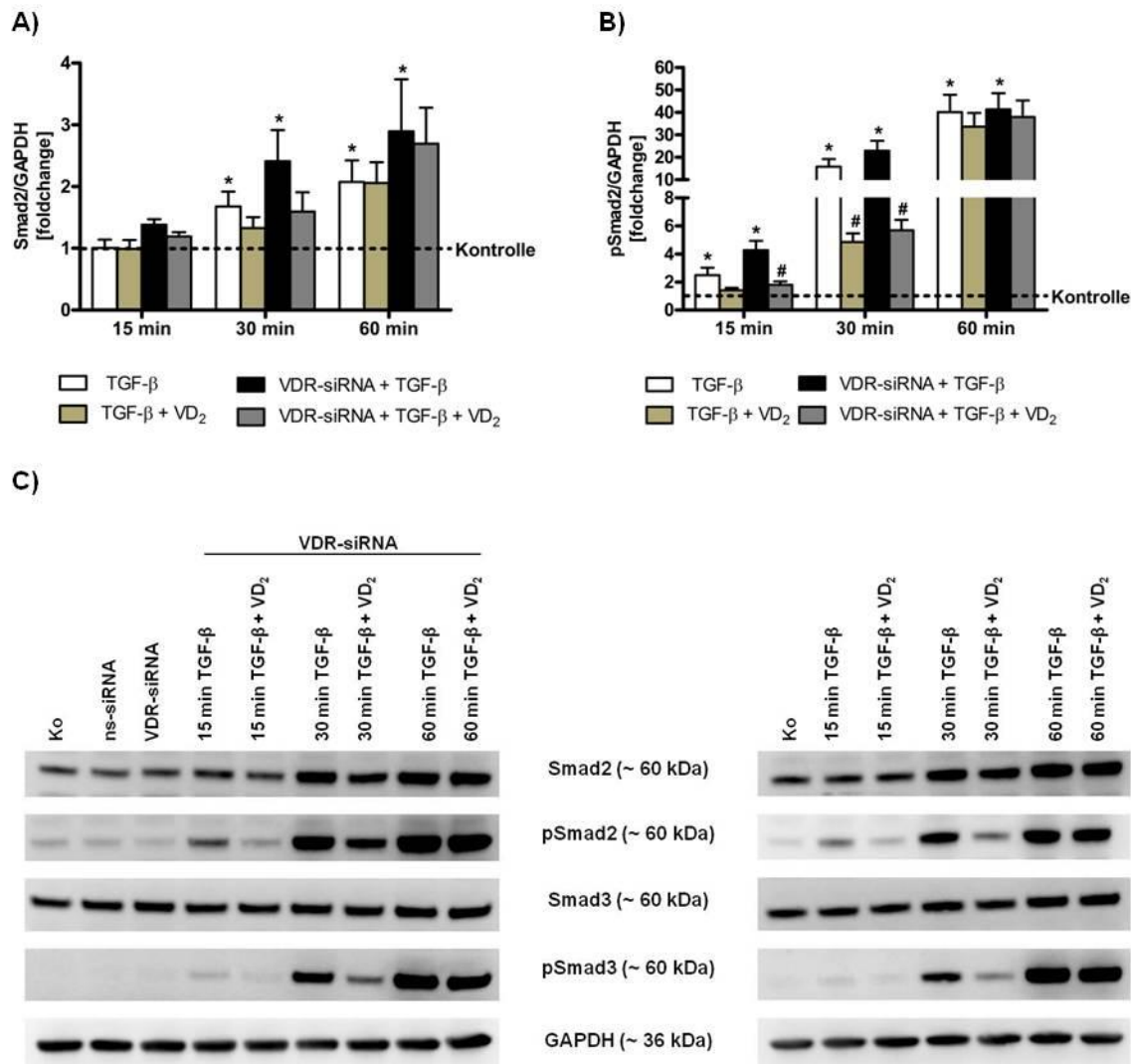
Die *ex vivo* nachgewiesene, gesteigerte Degradation des VDRs wurde *in vitro* nicht beobachtet. Daher lag es nahe, zu untersuchen, ob eine Trypsin-induzierte Degradation des VDR *in vitro* durch eine VD<sub>2</sub>-Supplementation antagonisierbar ist. Hierzu wurden pHSC für 1 h mit bzw. ohne VD<sub>2</sub> (1  $\mu\text{M}$ ) kultiviert, anschließend das Gesamtprotein-lysat isoliert und durch Zugabe unterschiedlicher Trypsinkonzentrationen zur VDR-Degradation stimuliert.

Wie Abbildung 52 zu entnehmen ist, wurde die VDR-Proteinexpression durch eine einstündige Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die durch Trypsin induzierte Degradation des Rezeptors war in den unbehandelten Gesamtproteinlysaten der pHSC deutlich ausgeprägter als in den vergleichbaren Proben, welche zuvor eine VD<sub>2</sub>-Behandlung erhalten hatten. (Abbildung 52). Dieses Resultat lässt vermuten, dass VD<sub>2</sub> in pHSC den VDR vor Degradation schützt.

### 3.6 Untersuchung der Expression verschiedener Signalwege nach gleichzeitiger Behandlung mit TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> in pHSC für 15 – 60 min

In den Langzeitexperimenten beeinflusste VD<sub>2</sub> in TGF- $\beta$  vorstimulierten pHSC ausschließlich die mRNA-Expression einiger Fibrose-relevanter Marker. Die durch die zelluläre VDR-Konzentration beeinflusste Aktivierung des Smad-Signalweges nach TGF- $\beta$ -Stimulation wurde durch VD<sub>2</sub> nur marginal beeinflusst.

Neben den bereits untersuchten transkriptionsbeeinflussenden  $VD_2$ -Wirkungen wurde nun die Rolle von  $VD_2$  auf kurzfristige zelluläre Effekte im Smad-Signalweg untersucht. Durch direkten Vergleich zwischen VDR-siRNA-transfizierten und WT-phHSC sollte zusätzlich eine Aussage über den Einfluss von VDR auf "nicht-genomische" Effekte des  $VD_2$  ermöglicht werden.



**Abbildung 53: Zeitabhängige Beeinflussung des TGF-β/Smad-Signalweges durch  $VD_2$  in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF-β-Stimulation.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad2 (A) und pSmad2 (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (Angaben als  $MW \pm SEM$ ). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western Blots der Smad-Mediatoren Smad2 und Smad3, sowie derer phosphorylierter Formen. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betragen  $p < 0,05$ . Eine  $VD_2$ -Supplementation inhibierte VDR-zellkonzentrationsunabhängig die Aktivierung des Smad-Signalweges.

Hierzu wurden sowohl transfizierte als auch WT-phHSC mit 0,5 ng/mL TGF-β bzw. 0,5 ng/mL TGF-β und  $VD_2$  über Zeiträume von 15–60 min inkubiert. Zu den

untersuchten Zeitpunkten erfolgte der Expressionsvergleich zwischen TGF- $\beta$  behandelten und mit TGF- $\beta$  + VD<sub>2</sub> inkubierten Zellen und die Überprüfung des VD<sub>2</sub>-Effektes auf eine mögliche VDR-Abhängigkeit.

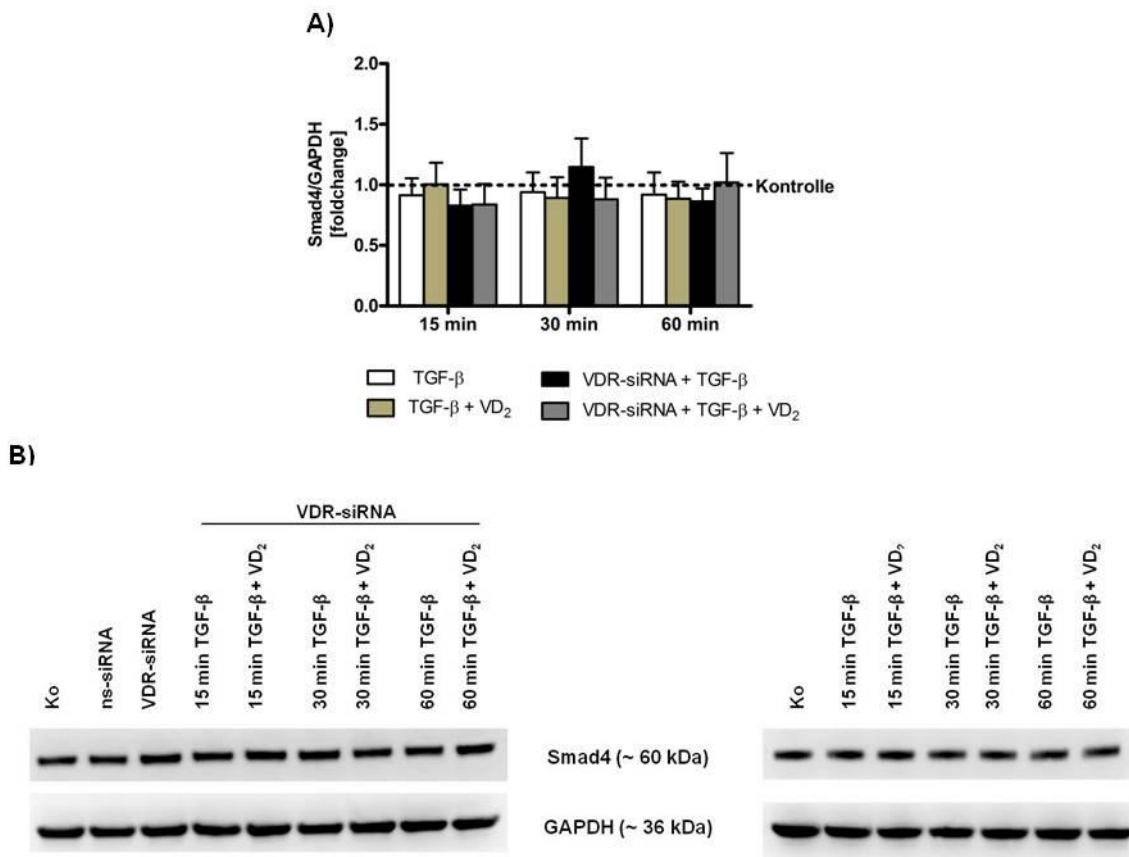
In dieser Experimentenreihe wurden die Aktivierung der Smad-Signalwegsmediatoren Smad2 und Smad3 überprüft. Eine quantitative Auswertung der Smad3-Aktivierung konnte aufgrund des fehlenden pSmad3 in der Kontrolle nicht durchgeführt werden.

Hier konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom VDR zu frühen Untersuchungszeitpunkten eine Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$  bzw. TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub> eine Aktivierung des Mediators Smad2 zur Folge hatte (Abbildung 53 B, C). Interessanterweise konnte zu den Zeitpunkten 15 und 30 min das zugegebene VD<sub>2</sub> die TGF- $\beta$ -Wirkung sowohl in VDR-siRNA-transfizierten als auch in WT-phHSC signifikant inhibieren (Abbildung 53 B, C). Dieser VD<sub>2</sub>-Effekt erlosch nach einer einstündigen Inkubation der Zellen (Abbildung 53 B, C). Ebenfalls wurde in allen phHSC durch Stimulation mit exogenem TGF- $\beta$  die Smad2-Gesamtproteinexpression nach 30 und 60 min im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 53 B, C).

Trotz nicht möglicher Quantifizierung der Aktivierung des Smad3-Proteins wurde in allen Experimenten ein ausgeprägter Anstieg der pSmad3-Expression detektiert (Abbildung 53 C). Wie auch bei dem Mediator Smad2 besaß VD<sub>2</sub> die Fähigkeit, zu den Zeitpunkten 15 und 30 min die durch TGF- $\beta$  hervorgerufene, gesteigerte Expression von pSmad3 zu antagonisieren (Abbildung 53 C). Die beobachteten Wirkungen auf die Aktivierung von Smad3 waren auch in diesem Falle nicht vom VDR-abhängig (Abbildung 53 C). Bei der Betrachtung von Smad3 zeigte sich ebenfalls nach 30 min Inkubation eine durch TGF- $\beta$  verursachte Steigerung der Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 53 C).

Für die nukleäre Translokation der aktivierten Smad2- und Smad3-Mediatoren ist deren Komplexbildung mit der Smad4-Komponente erforderlich. Aufgrund der durch VD<sub>2</sub> verursachten Verringerung von pSmad2 und pSmad3 war es von Interesse, eine mögliche Wirkung auf das Smad4-Molekül zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass im untersuchten Zeitraum weder TGF- $\beta$ , VD<sub>2</sub> noch VDR einen Einfluss auf die Expression von Smad4 hatten (Abbildung 54).

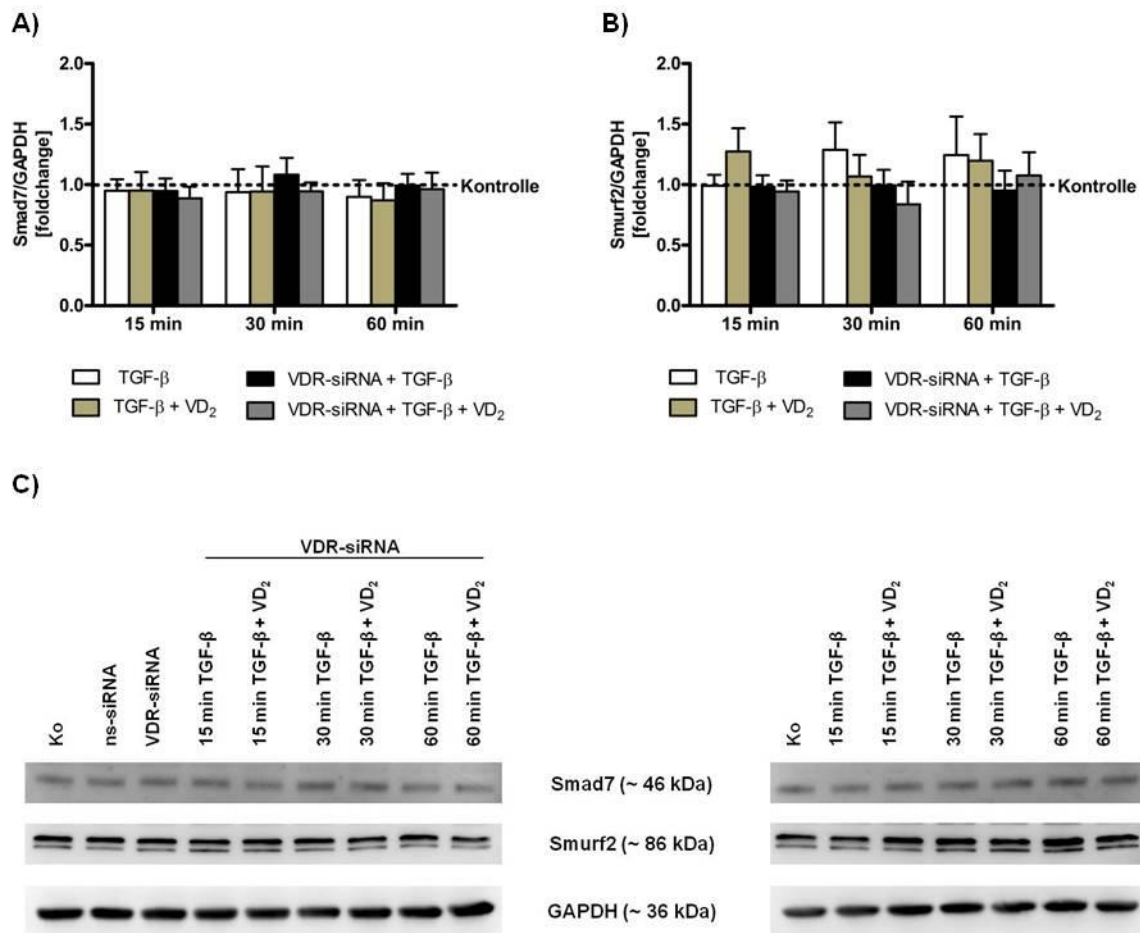




**Abbildung 54: Zeitabhängige Beeinflussung des TGF-β/Smad-Signalweg-Mediators Smad4 durch VD<sub>2</sub> in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF-β-Stimulation.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad4 (A) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (Angaben als MW ± SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und auf wurde GAPDH normalisiert. B) zeigt ein repräsentatives Western Blot von Smad4. Die Signifikanzniveaus (\*) im Bezug zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrugen  $p < 0,05$ . Die Smad4-Expression wurde durch die Behandlungen nicht beeinflusst.

Um die verzögerte VD<sub>2</sub>-abhängige Aktivierung des TGF-β-Signalweges besser beurteilen zu können, erfolgte die Untersuchung der Expression inhibitorischer Moleküle des TGF-β/Smad-Signalweges. Wie auch zuvor wurden in dieser Arbeit die Inhibitoren Smad7 und Smurf2 untersucht. Weder durch die Behandlung mit TGF-β bzw. TGF-β und VD<sub>2</sub> noch durch eine differente zelluläre VDR-Expression wurde einer der beiden Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle in seiner Expression verändert (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Zeitabhängige Beeinflussung von Smad7 und Smurf2 durch VD<sub>2</sub> in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$ -Stimulation.**

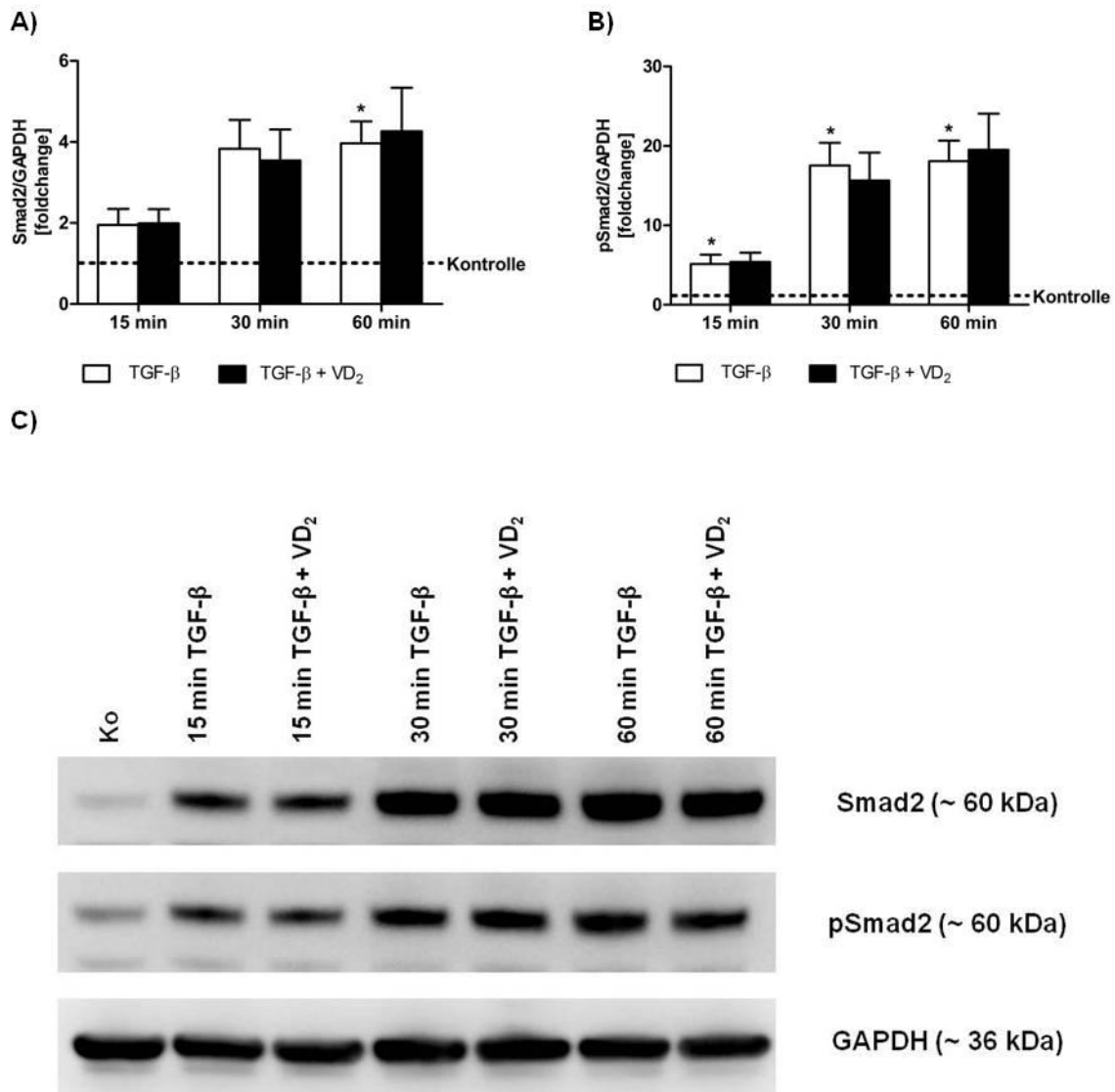
Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad7 (A) und Smurf2 (B) in WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC (Angaben als MW  $\pm$  SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und wurde auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western Blots von Smad7 und Smurf2. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle und (#) im Vergleich zur VDR-siRNA betrug  $p < 0,05$ . Die verzögerte Aktivierung des Smad-Signalweges durch VD<sub>2</sub> fand ohne Beeinflussung der Inhibitor-Expressionen statt.

Zusammengefasst scheint VD<sub>2</sub> entweder direkt über eine Aktivierung anderer Transmembranrezeptoren oder durch Inhibition einer „*upstream*“ befindlichen Smad-Signalwegskomponente die Phosphorylierung der Smad-Mediatoren Smad2 und Smad3 kurzfristig zu inhibieren. Jedoch wurde dies nicht durch eine gesteigerte Expression der Inhibitoren Smad7 und Smurf2 verursacht.

### 3.7 Expression von Smad2 nach Behandlung mit TGF- $\beta$ und 30-minütiger VD<sub>2</sub>-Vorinkubation in pHSC für 15 – 60 min

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob die bei gleichzeitiger Zugabe von TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub> beobachtete verzögerte Aktivierung des Smad-Signalweges auch in pHSC

mit 30-minütiger VD<sub>2</sub>-Vorstimulation detektiert werden konnte. Hierzu wurde ein Teil der pHSC mit 1 µM VD<sub>2</sub> vorinkubiert und anschließend für 15–60 min mit TGF-β behandelt.



**Abbildung 56: Zeitabhängige Beeinflussung des TGF-β/Smad-Signalweges durch eine VD<sub>2</sub>-Vorinkubation in pHSC mit 0,5 ng/mL TGF-β-Stimulation.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Smad2 (A) und pSmad2 (B) in pHSC (Angaben als MW ± SEM). Die Auswertung erfolgte densitometrisch und auf GAPDH normalisiert. C) zeigt repräsentative Western Blots des Smad-Mediators Smad2 sowie dessen phosphorylierte Form. Die Signifikanzniveaus (\*) im Vergleich zur Kontrolle betrugen p < 0,05. Eine VD<sub>2</sub>-Vorinkubation beeinflusste die Aktivierung des Smad-Signalweges nicht.

In dieser Experimentenreihe verursachte eine exogene TGF-β-Gabe VD<sub>2</sub>-unabhängig eine signifikante Aktivierung des Smad-Signalweges (Abbildung 56).

Interessanterweise wurde bei pSmad2 nach 30 min ein Aktivierungsplateau erreicht (Abbildung 56). Eine Inhibition der Phosphorylierung wurde durch eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit VD<sub>2</sub> nicht erzielt (Abbildung 56).

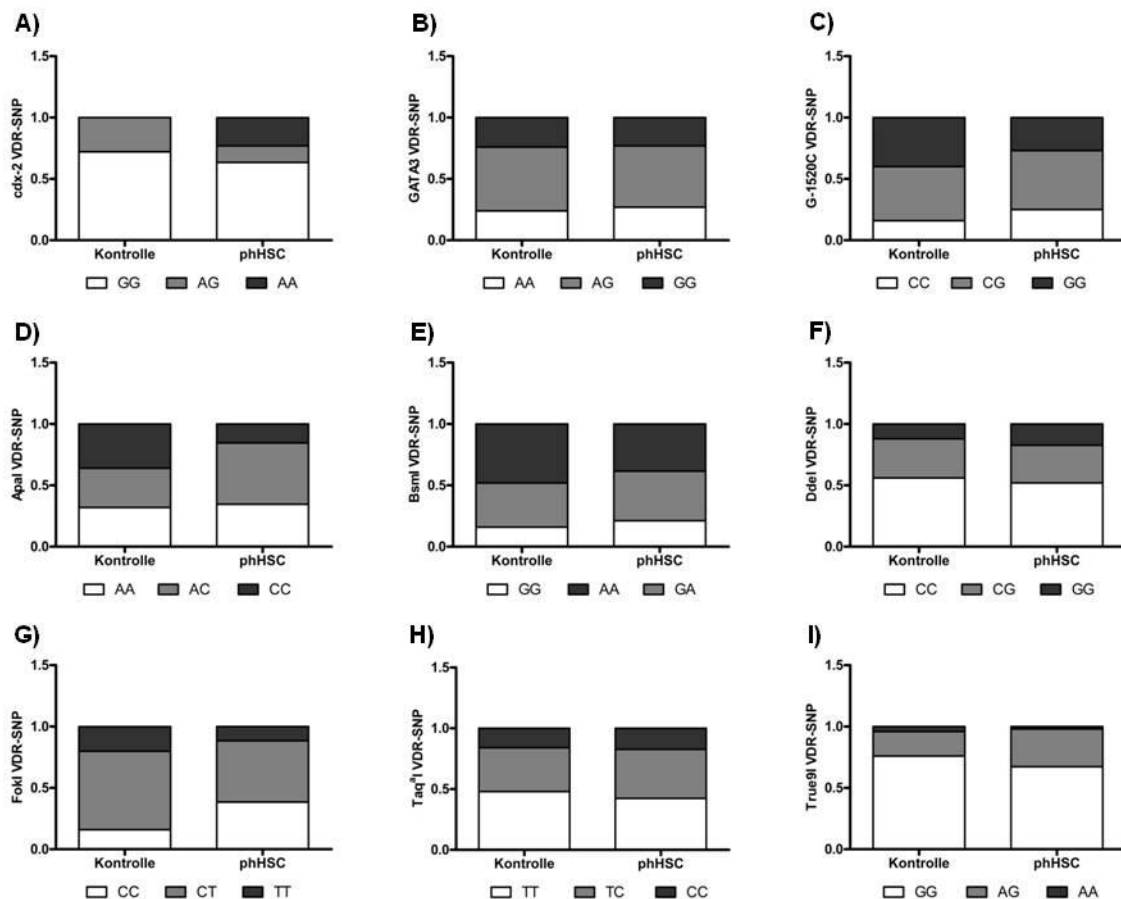
Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass VD<sub>2</sub> ausschließlich bei gleichzeitiger Gabe von TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub> inhibitorisch auf die Induktion des Smad-Signalweges wirkte.

### 3.8 Vitamin D-Rezeptor-SNP

Im Gegensatz zu den "nicht-genomischen" Wirkungen von VD<sub>2</sub> setzten die unter 3.2.4.2 durch VD<sub>2</sub> beobachteten transkriptionalen Änderungen eine Interaktion mit dem VDR voraus. Die durch diese Interaktion unter 3.2.4.2 beobachteten transkriptionalen Genexpressionsänderungen könnten durch den VDR-Genotyp beeinflusst worden sein.

In einigen Studien zum VDR-Polymorphismus wurde ein Abhängigkeit der Risiken für malignes Melanom (Halsall *et al.*, 2004), Psoriasis (Halsall *et al.*, 2009; Halsall *et al.*, 2005), Karzinome epithelialen Ursprungs (Ochs-Balcom *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007), primäre biliäre Zirrhose (Adorini *et al.*, 2009; Falletti *et al.*, 2010, Halmos *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2009), HCC (Falletti *et al.*, 2010) und Autoimmunhepatitis (Vogel *et al.*, 2002) vom VDR-Polymorphismus nachgewiesen. Besonders die Ergebnisse zur primären biliären Zirrhose und zum HCC ließen vermuten, dass auch die Expression Fibrose-relevanter Gene in den pHSC durch VDR-Polymorphismen beeinflusst wird. Um einen ersten Einblick in einen möglichen Zusammenhang zwischen VDR-Genotyp, VD<sub>2</sub>-Wirkung und Fibroseprogress zu erhalten, wurde jedes pHSC-Isolat auf neun bekannte VDR-SNP untersucht.

Hierzu wurde im ersten Schritt ein Vergleich der Genotypverteilung zwischen der Kontroll- und Patientengruppe erstellt. Diese direkte Gegenüberstellung der einzelnen Genotypen eines VDR-SNP ermöglichte, ein vermehrtes Genotyp-spezifisches Auftreten in Patienten im Bezug zur Kontrolle zu detektieren. Eine annähernd gleiche Verteilung der Genotypen wurde für die VDR-SNP Gata-3, G-1520C, BsmI, Tap<sup>aI</sup> und Tru9 beobachtet (Abbildung 57 B, C, E, H, I). Allerdings zeigte sich eine veränderte Genotyp-Verteilung im cdx-2 VDR-SNP zu Gunsten des AA-Genotypes im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 57 A). Des Weiteren wurde in den pHSC der Patienten ein vermehrtes Auftreten des AG-Genotypes und eine Abnahme des CC-Genotypes im Apal VDR-SNP beobachtet (Abbildung 57 D).

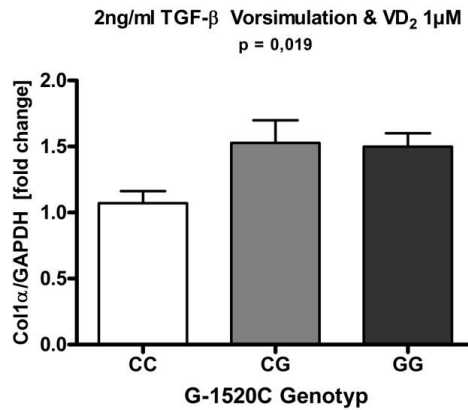


**Abbildung 57: VDR-Genotypverteilung in der pHSC- und Kontrollgruppe.**

Graphische Darstellung der Verteilung der VDR-SNP-Genotypen cdx2 (A), Gata3 (B), G-1520C (C), Apal (D), BsmI (E), Ddel (F), FokI (G), Taq<sup>al</sup> (H) und True9I (I) in Kontrollen und pHSC. Differenzen in der VDR-SNP-Verteilung zwischen Kontrollen und pHSC wurde für cdx2, Apal, Ddel und FokI beobachtet.

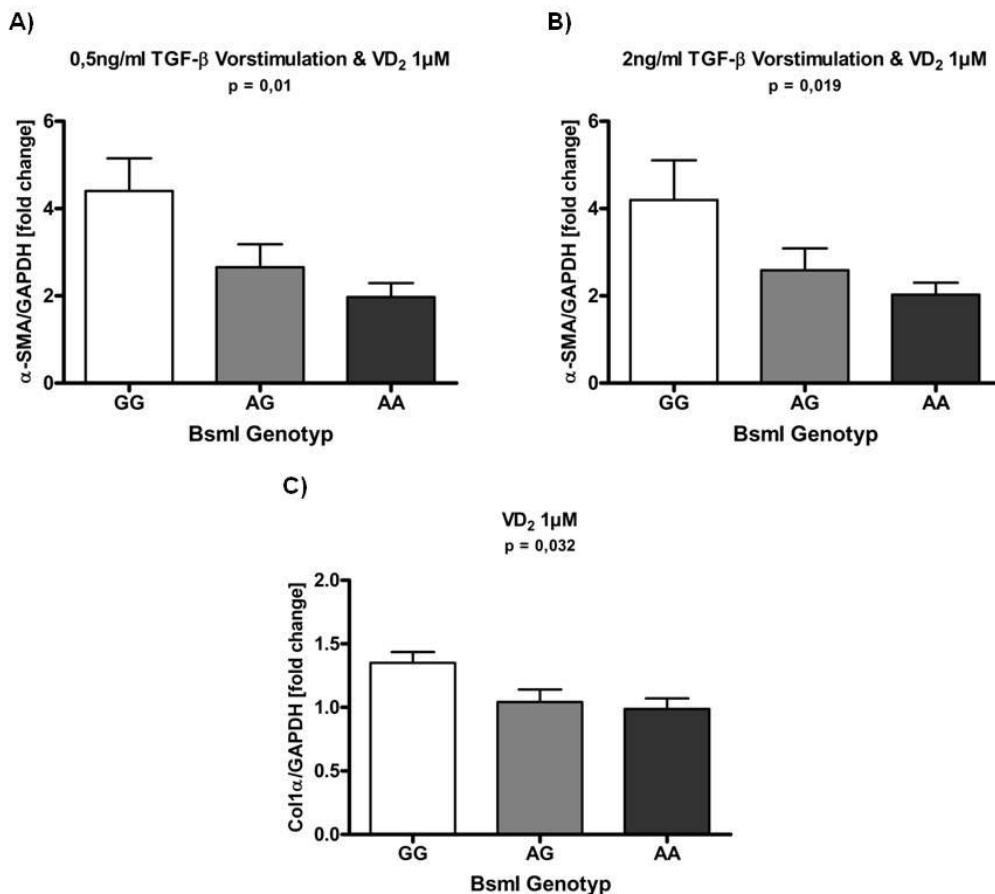
Auch der Ddel- VDR-SNP wies eine unterschiedliche Genotyp-Verteilung zwischen der Kontroll- und Patientengruppe auf (Abbildung 57 F). In den pHSC der Patienten wurde ein gehäuftes Auftreten des CC-Genotypes bei gleichzeitig verringerter Anwesenheit des CG-Genotyps beobachtet (Abbildung 57 F). Weiterhin lagen in der Patientengruppe bei dem FokI VDR-SNP ein vermehrter CC- und ein verringerter CT-Genotyp vor (Abbildung 57 G).

Zusammenfassend zeigten sich Unterschiede in der Genotyp-Verteilung in den VDR-SNPs cdx-2, Apal, Ddel und FokI zwischen der Kontroll- und Patientengruppe. Die durchgeführten multivariaten Analysen sollten Korrelationen zwischen den durch VD<sub>2</sub>- und TGF- $\beta$ -Behandlung hervorgerufenen Expressionen Fibrose-relevanter Parameter und den vorhandenen VDR-Genotypen ermitteln.



**Abbildung 58: Proteinexpression von Col1α in Abhängigkeit des G-1520C Genotyps.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Col1α in Abhängigkeit vom VDR-SNP G-1520C (MW ± SEM). Die Anwesenheit des G-Allels war mit einer stärkeren Col1α-Expression assoziiert.



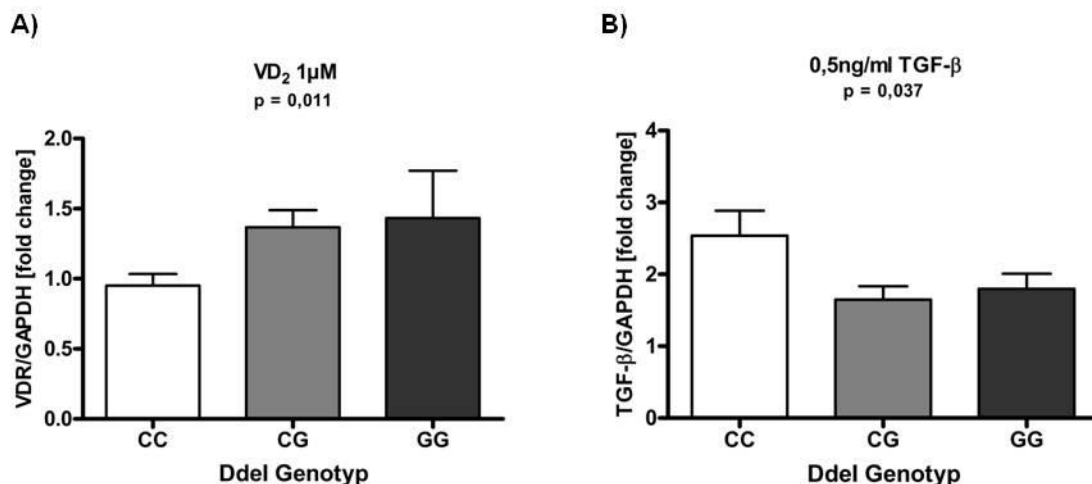
**Abbildung 59: Proteinexpression von α-SMA und Col1α in Abhängigkeit des BsmI Genotyps.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von α-SMA in mit 0,5 ng/mL (A) oder 2 ng/mL TGF-β (B) vorstimulierten pHSC und Col1α-Expression (C) nach VD<sub>2</sub>-Behandlung in unstimulierten pHSC in Abhängigkeit vom VDR-SNP BsmI (MW ± SEM). Die Anwesenheit des A-Allels war assoziiert mit einer geringeren α-SMA- und Col1α-Expression.

In dieser Arbeit konnten fünf VDR-SNP ermittelt werden, deren Genotyp die Stimulation der Fibrose beeinflussen. Mit einem Spearman-Rho-Koeffizienten von  $p = 0,019$  konnte eine Genotyp-abhängige Stimulation der Fibrose in pHSC durch den in der 1A-Promotorregion befindlichen VDR-SNP, G-1520C, detektiert werden. In diesen pHSC-Isolaten war das Auftreten des G-Allels mit einer vermehrten Col1 $\alpha$ -Proteinexpression verbunden (Abbildung 58).

Neben dem im Promotobereich befindlichen VDR-SNP G-1520C beeinflusste auch der im Intron 8 befindliche VDR-SNP BsmI die Expression Fibrose-relevanter Marker. Sowohl in TGF- $\beta$  vorstimulierten als auch unstimulierten pHSC begünstigte der homozygote Genotyps (GG) die Fibrogenese (Abbildung 59 A, B). Dies wurde sowohl durch den im BsmI (G/G) 4-fachen Anstieg von  $\alpha$ -SMA-Protein im Vergleich zum nur 2-fachen Anstieg bei BsmI (AG und AA) in der VD-Behandlung TGF- $\beta$ -vorstimulierter pHSC (Abbildung 59 A, B) als auch anhand der fehlenden Inhibition der Col1 $\alpha$ -Proteinexpression durch VD<sub>2</sub> in unstimulierten pHSC verifiziert (Abbildung 59 C).

Der VDR-SNP Ddel zeigte im Vergleich mit anderen SNPs die meisten Korrelationen. So ergab sich eine Assoziation (Spearman Rho:  $p = 0,037$ ) zwischen dem homozygoten Genotyp Ddel (C/C) und einer gesteigerten endogenen TGF- $\beta$ -Expression (Abbildung 60 B).

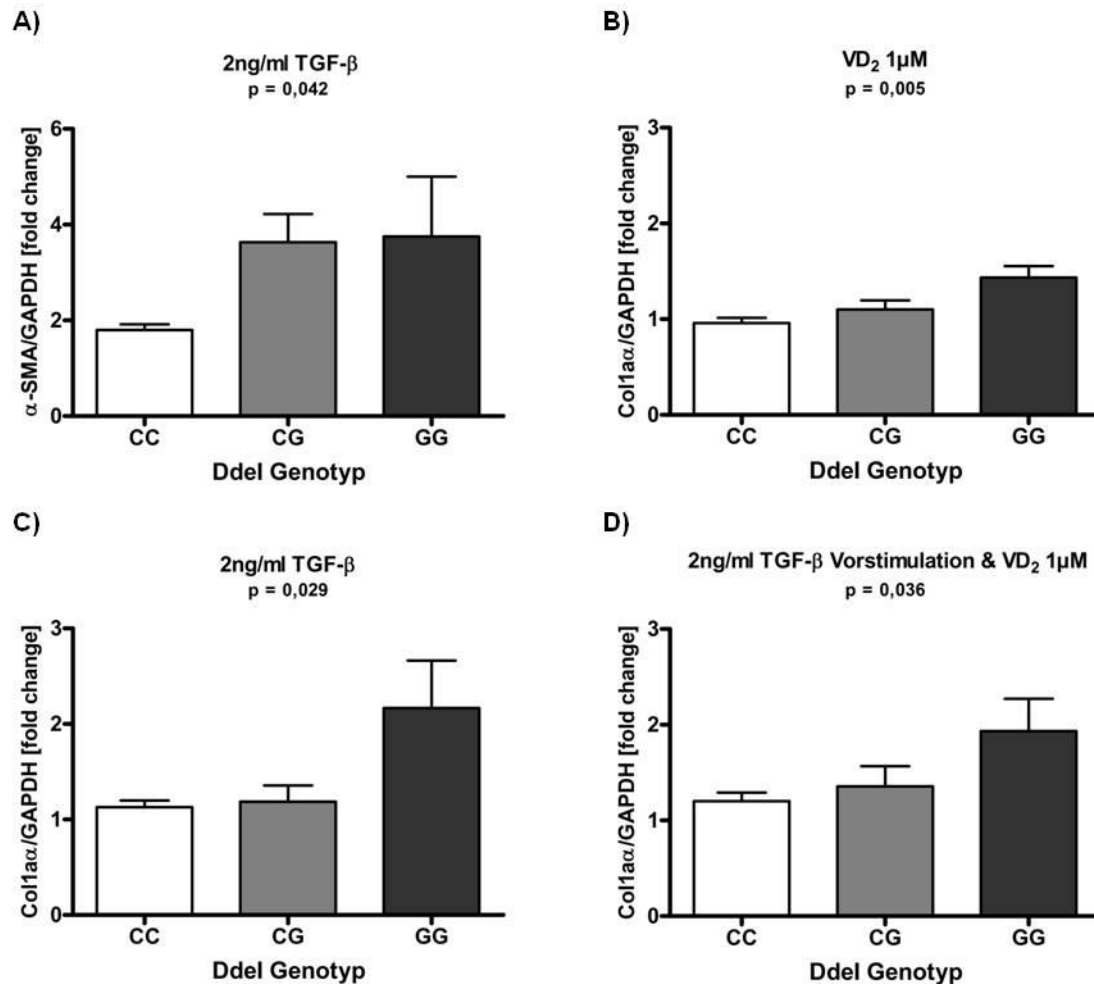


**Abbildung 60: Proteinexpression von VDR und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit vom Ddel Genotyp.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von VDR (A) und TGF- $\beta$  (B) in Abhängigkeit vom VDR-SNP Ddel (MW  $\pm$  SEM). Ein homozygoter Ddel (C/C)-Genotyp ging mit fehlender VDR-Stimulation und paralleler, stärkerer TGF- $\beta$ -Expression einher.

Interessanterweise konnte diese Assoziation hinsichtlich der Expression Fibrose-relevanter Strukturproteine ( $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$ ) nicht aufrecht erhalten werden (Abbildung 61): Während das Auftreten eines G-Allels mit einem Anstieg von  $\alpha$ -SMA (Abbildung

61 A) und VDR (Abbildung 60 A) einher ging, erforderte die vermehrte Expression von Col1 $\alpha$  einen homozygoten Genotyp (G/G) (Abbildung 61 B, C, D). Besonders auffällig war, dass die vermehrte Col1 $\alpha$ -Expression nicht nur durch exogene TGF- $\beta$ -Stimulation (Abbildung 61 C), sondern auch durch Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> (Abbildung 61 B, D) diese Assoziation aufwies.

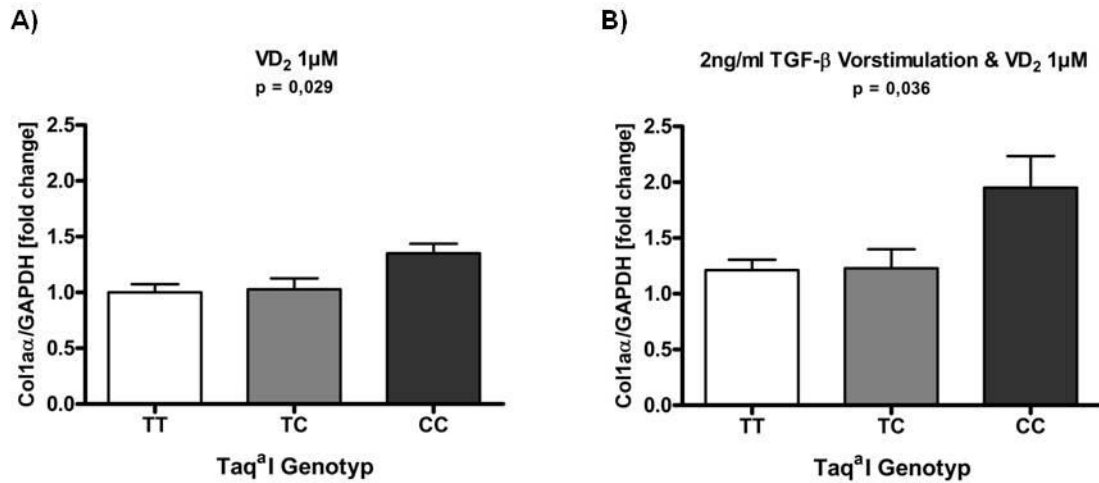


**Abbildung 61: Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  in Abhängigkeit vom Ddel Genotyp.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von  $\alpha$ -SMA (A) sowie von Col1 $\alpha$  in unstimulierten (B) und mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  (C, D) vorstimulierten pHSC (MW  $\pm$  SEM). Die Anwesenheit des G-Allels war assoziiert mit einer stärkeren  $\alpha$ -SMA- und Col1 $\alpha$ -Expression.

Bei der Untersuchung des VDR-SNP Taq<sup>a</sup>I, welcher im Exon 9 lokalisiert ist, bewirkte die Behandlung der Zellen mit VD<sub>2</sub> sowohl in unstimulierten als auch in mit 2 ng/mL TGF- $\beta$  stimulierten pHSC eine gesteigerte Col1 $\alpha$ -Proteinexpression in Anwesenheit des homozygoten Genotyps Taq<sup>a</sup>I (C/C) (Abbildung 62).





**Abbildung 62: Proteinexpression von Col1α in Abhängigkeit des Taq<sup>a</sup>I Genotyps.**

Graphische Darstellung der relativen Proteinexpressionen von Col1α in unstimulierten (A) und mit 2 ng/mL TGF-β (B) vorstimulierten pHSC (MW ± SEM). Der homozygote CC-Genotyp war assoziiert mit einer stärkeren Col1α-Expression.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass nicht nur die Ätiologie, sondern auch die Gensequenz des VDRs eine wesentliche Rolle in der Ansprechbarkeit von HSC auf TGF-β und VD<sub>2</sub> und damit auf den Fibroseprogress spielt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hintergründe und Zusammenhänge

Das über Jahrzehnte ausschließlich als Regulator der Kalziumhomöostase angesehene VD gewann durch die intensive Forschung der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung. Dabei konnten verschiedene nicht-kalzämische Effekte in diversen humanen Erkrankungen, wie Karzinomen, Autoimmunerkrankungen, Multipler Sklerose, Adipositas und Diabetes mellitus nachgewiesen werden (Grant *et al.*, 2005; Holick *et al.*, 2004; Pike *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2012). VD moduliert über den VDR-Signalweg immunologische und endokrinologische Prozesse sowie die zelluläre Proliferation und Differenzierung (Yang *et al.*, 2012; Kwok *et al.*, 2013; Putz-Bankuti *et al.*, 2012, Fingas *et al.*, 2012).

In verschiedenen klinischen Studien zeigte sich für VD (das im menschlichen Organismus erst durch Metabolisierungen in Leber und Niere biologisch aktiviert wird), eine Assoziation zwischen VD-Mangel und chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien (Grünhage *et al.*, 2012; Miroliaee *et al.*, 2010). Allerdings wird oder werden die Rolle(n) des VDs in der Entwicklung chronischer Lebererkrankungen noch nicht wirklich verstanden.

Unterschiedliche chronische Lebererkrankungsbilder wie z.B. die NAFLD oder virale Hepatitiden weisen im fortschreitenden Verlauf durchweg eine Fibrosierung des Leberparenchyms auf. Die Behandlung einer Leberfibrose ist aufgrund der bis heute ineffektiven Therapieoptionen unzureichend. Daher ist es dringend erforderlich, die Mechanismen in der Entwicklung der Leberfibrose genauer zu verstehen. Hierfür eignen sich durchaus *in vitro*-Modelle, da Zellkulturmodelle frisch isolierter HSC die in der Fibrose mit der HSC-Aktivierung und Transdifferenzierung einhergehenden Phänotyp-Veränderungen imitieren können (Inagaki *et al.*, 2001; Geerts *et al.*, 1989).

In humanen HSC wurden bis heute die funktionellen Auswirkungen des VD und VDR in der Leberfibrose nicht vollständig untersucht. Die deutlich detektierbare VDR-Expression in HSC (Ding *et al.*, 2013; Gascon-Barre *et al.*, 2003) ermöglichte in dieser Arbeit die Untersuchung der Wirkungen von VD<sub>2</sub> und des VDR (mittels VDR-siRNA-Transfektion) auf Fibrose-relevante Proteine.

## **4.2 Auswirkungen des NAFLD-Schweregrades auf den Vitamin D-Status und die Expression von VDR im Lebergewebe**

In einem NAFLD-Patientenkollektiv von 82 Patienten und 10 Kontrollen, als Beispiel eines Kollektivs mit einer chronischen Lebererkrankung, sollten die möglichen Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad der Erkrankung, der VD-Serumkonzentration und der VDR-Expression in einem humanen System ermittelt werden.

Während viele andere Studien zur Einteilung des NAFLD-Schweregrades immer noch die Histologie aus Leberbiopsien oder den Ultraschall verwenden (Gomez-Ramirez *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2011), erfolgte in dieser Studie die Einteilung des NAFLD-Patientenkollektivs in NAFL und NASH anhand der Serumkonzentration des nicht-invasiven Biomarkers Cytokeratin 18 (Feldstein *et al.*, 2009; Alkhoury *et al.*, 2011). Dieser Differenzierungsmarker reflektiert die Apoptose der Hepatozyten als Hauptmechanismus des Leberschadens im Serum. Seine Relevanz wurde in einer multizentrischen Studie bestätigt (Alkhoury *et al.*, 2011). In diesen jeweiligen Gruppen wurden sowohl verschiedene Routinelaborparameter (z.B. leberspezifische Transaminasen, VD-Status, Bilirubin, Blutzuckerspiegel und FFA) als auch die Expression des VDR sowie Fibrose-relevanter Faktoren bestimmt.

In Übereinstimmung mit den Studienergebnissen von Adams *et al.* (2011) konnten auch in diesem Patientenkollektiv in der NASH-Kohorte signifikant erhöhte Lebertransaminasen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Ebenso zeigte sich eine vergleichsweise stärkere Erhöhung der Transaminase ALT gegenüber der AST. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Kopec *et al.* (2011). Zudem wies der sensible Indikator einer Lebererkrankung – die Lebertransaminase ALT – signifikant höhere Serumkonzentrationen in der NASH-Gruppe im Vergleich zu NAFL-Patienten auf. Interessanterweise zeigte sich in diesem Kollektiv eine wahrscheinliche Abhängigkeit des inflammatorischen Zytokins MCP-1. Dessen erhöhte Expression könnte die mit der NASH einhergehende Inflammation reflektieren. Ob und inwiefern dieser Parameter als zusätzlicher nicht-invasiver Marker zur Einteilung des Schweregrades der NAFLD genutzt werden kann, müsste in einem größeren Patientenkollektiv ermittelt werden.

Auch die sich mit der NAFLD einhergehende, gesteigerte Kollagen-Deposition (Tsukada *et al.*, 2006) untermauert die korrekte Einteilung der NAFLD-Kohorte in NAFL und NASH anhand der Serumkonzentration des nicht-invasiven Biomarkers Cytokeratin 18 mit einem Grenzwertes von 275 U/L. Interessanterweise spiegelte

sich die durch die vermehrte Kollagenbildung angenommene Aktivierung und Transdifferenzierung der HSC in der Expression des Transdifferenzierungsmarkers  $\alpha$ -SMA nicht wieder. Wie auch bei Kopec *et al.* (2011) zeigte sich hier ein inhomogenes Expressionsverhalten innerhalb der NAFLD-Untergruppen. Jedoch scheint dieser Marker bei der immunhistologischen Einteilung Verwendung finden zu können, da dort in der NASH-Gruppe ein vermehrtes Vorkommen von  $\alpha$ -SMA in lobulären Arealen gezeigt werden konnte. Nicht nur das zytoskelettale Protein  $\alpha$ -SMA, sondern auch das profibrotische Zytokin TGF- $\beta$ , welches bei NAFLD-Patienten keine gesteigerte Expression aufwies, deuten darauf hin, dass Ergebnisse in NASH-Tiermodellen, welche eine gesteigerte  $\alpha$ -SMA und TGF- $\beta$  mRNA-Expression zeigen (Tsukada *et al.*, 2006; Starkel *et al.*, 2003), nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können.

Die für die NAFLD mehrfach beschriebene Assoziation mit Adipositas und mit dieser einher gehenden Störungen des Lipid- und Glukosemetabolismus' (Carmiel-Haggai *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2012; Barchetta *et al.*, 2011; Kopec *et al.*, 2011, Bechmann *et al.*, 2012) konnten durch die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse untermauert werden. Die in den Patienten detektierte massive Erhöhung der Serumkonzentrationen von FFA und des Langzeit-Blutzuckers (wie anhand des HbA1c ermittelt) gehen mit einer signifikanten Reduktion des VD-Spiegels einher. Dies untermauert die von Barchetta *et al.* (2011) aufgestellte These, dass VD regulatorisch auf den FFA-Metabolismus und somit auf die Entwicklung der NAFLD wirkt. Übereinstimmend mit früheren Studien konnte eine Assoziation zwischen VD-Mangel und NAFLD auch in dieser Kohorte gezeigt werden; demgegenüber ließ sich die mehrfach beschriebene Korrelation zwischen VD-Mangel und Schweregrad der NAFLD (Rhee *et al.*, 2013; Barchetta *et al.*, 2011; Kwok *et al.*, 2013) nicht bestätigen. Wie auch in der Studie von Katz *et al.* (2010) an 1630 Jugendlichen, zeigte auch die hier vorliegende Studie an einem Patientenkollektiv im Alter von 18–60 Jahren keine Assoziation zwischen VD-Mangel und NAFLD-Schweregrad. Auch die von Wobser *et al.* (2009) beschriebene Korrelation zwischen FFA-Serumkonzentration und NAFLD-Schweregrad konnte in diesem Kollektiv nicht bestätigt werden.

Aufgrund des Einflusses von VD auf die Entwicklung einer NASH (Barchetta *et al.*, 2011) sollte nunmehr der diesem Einfluss zugrunde liegende Mechanismus hinterfragt werden. Hierbei spielt explizit der VDR eine zentrale Rolle, da dieser für die genomische Wirkung des VD essentiell ist. Die leicht erhöhte Expression der

VDR-mRNA in NASH-Patienten lässt einen kompensatorischen Mechanismus aufgrund des VD-Mangels vermuten. Dieser spiegelte sich jedoch nicht auf der Proteinebene wieder. Hier zeigte das Gesamtkollektiv konstant eine signifikant geringere Expression des Gesamtlängen-Proteins im Vergleich zur Kontrolle. Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Weise von Barchetta *et al.* (2012) berichtet. Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Abhängigkeit mit dem Schweregrad der NAFLD. Die von Barchetta *et al.* (2012) postulierte inverse Korrelation zwischen VDR-Expression und dem Schweregrad der Erkrankung zeigte sich in der hier untersuchten Patientenkohorte nicht. Demgegenüber wurde in der vorliegenden Studie in NAFLD-Patienten erstmals neben dem reduzierten Gesamtlängen-Protein eine signifikante Zunahme eines 20 kDa-VDR-Fragments im Vergleich zur Kontrolle detektiert – und in der Tat könnte eine Zuordnung in NAFL und NASH anhand der Zunahme des degradierten VDR-Proteins getroffen werden.

#### **4.3 Auswirkungen einer FFA- und VD<sub>2</sub>-Behandlung auf die Expression Fibrose-relevanter Marker in isolierten pHSC**

Trotz des bis heute nicht vollständig verstandenen Pathomechanismus' der NAFLD werden die Insulinresistenz und die Dyslipämie zu den Schlüsselfaktoren dieser Erkrankung gezählt (Hafeez *et al.*, 2013; Rombouts *et al.*, 2010; Garcia-Monzon *et al.*, 2011). Dabei verursacht die exzessive unregulierte FFA-Akkumulation in den Hepatozyten mit resultierender oxidativer Schädigung die Progression zur NASH mit perizellulärer Fibrose, lobulärer Inflammation und hepatozellulärem "Ballooning" (Sanyal *et al.*, 2005; Tolman *et al.*, 2007; Wobser *et al.*, 2009; Farrell *et al.*, 2008). Neben der starken FFA-Akkumulation wurde in verschiedenen Studien eine inverse Korrelation der VD-Konzentration mit dem Schweregrad der NAFLD, der Nekroinflammation und der Fibrose beschrieben (Geier *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2011; Kitson *et al.*, 2012).

Bei der für die NASH charakteristischen fibrogenen Entwicklung wird in vielen Studien die Aktivierung der HSC angenommen (Rombouts *et al.*, 2010). Weitere Nachweise für die Beteiligung der HSC in der Progression der NAFLD bestehen darin, dass diese Zellen durch parakrine Faktoren (Friedman *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008), welche aus einer lobulären Inflammation während der NASH resultieren, sowie durch die Phagozytose apoptotischer Hepatozyten (Canbay *et al.*, 2003b) – einem Hauptmechanismus des Leberschadens in der NAFLD (Adams *et al.*, 2011) – zur Aktivierung und Transdifferenzierung in Myofibroblasten stimuliert werden. Des Weiteren werden

bis heute die HSC als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix angesehen (Wells *et al.*, 2006; Hernandez-Gea *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2008a). Auch sind HSC der einzige hepatische Zelltyp mit einer robust detektierbaren VDR-Expression (Ding *et al.*, 2013; Gascon-Barre *et al.*, 2003; Bookout *et al.*, 2006), die durch eine HSC-Aktivierung reduziert wird (Abramovitch *et al.*, 2011). Dieser Hintergrund, zusammen mit den stark veränderten Expressionsraten von Col1 $\alpha$  und VDR bei NAFLD-Patienten, bedingen die Untersuchung der Auswirkungen von FFA und VD auf HSC.

Trotz der durch die Immortalisierung hervorgerufenen besseren Reproduzierbarkeit experimenteller Ergebnisse in HSC-Zellkulturlinien wurden in dieser Arbeit Primärzellen verwendet. Grund hierfür ist, dass isolierte primäre humane HSC die zellulären Pathomechanismen während der Entwicklung der Leberfibrose im humanen System durch ihre fehlende Langzeitanpassung an die Kulturbedingungen – wie bei HSC-Zellkulturlinien der Fall – deutlich besser widerspiegeln (Friedman *et al.*, 2008b; Inagaki *et al.*, 2001; Geerts *et al.*, 1989). Die für die FFA *in vitro*-Experimente verwendeten pHSC stammten aus humanem, augenscheinlich Tumor-unbelastetem Lebergewebe und unterlagen keiner Differenzierung hinsichtlich Ätiologie und medikamentöser Therapie.

Eine Behandlung der pHSC mit FFA diene der *in vitro*-Imitation einer NAFLD. Aufgrund des von Barchetta *et al.* (2011) beschriebenen Zusammenhanges zwischen VD-Mangel, FFA-Metabolismus und NAFLD-Entwicklung sollte hier in pHSC überprüft werden, ob eine VD-Substitution eine FFA-induzierte Veränderung beeinflusst. Die hier eingesetzte FFA-Mischung, welche den wichtigsten Fettsäuren in der Ernährung und im Serum bei NAFLD-Patienten entsprach (Baylin *et al.*, 2002; Zelber-Sagi *et al.*, 2011), wurden wie folgt verwendet: zwei Teile der einfach ungesättigten Ölsäure und ein Teil der gesättigten Palmitinsäure, welche aus den Arbeiten von Feldstein *et al.* (2004) und Sydor *et al.* (2013) übernommen und an die pHSC angepasst wurde.

Den physiologischen Bedingungen in NAFLD-Patienten nachempfunden wurde in dieser Arbeit das pflanzliche Vitamin D<sub>2</sub> verwendet. Da es ausschließlich über den enterohepatischen Kreislauf direkt in die Leber gelangt, kann die abnorm gesteigerte Speicherung in den Adipozyten und somit die limitierte Bioverfügbarkeit von VD (Lim *et al.*, 2012; Rosenstreich *et al.*, 1971; Wortsman *et al.*, 2000) umgangen werden.

Bevor Untersuchungen der Stoffwechselveränderungen erfolgen konnten, musste zunächst die Aufnahmefähigkeit der pHSC für FFA und VD<sub>2</sub> überprüft werden. Die

von Sydor *et al.* (2013) nachgewiesene Akkumulation von Fettvakuolen in Hepatozyten konnte in dieser Arbeit auch in pHSC beobachtet werden. Interessanterweise wurde die in vielen Studien häufig für Hepatozyten beschriebene exzessive FFA-Aufnahme ebenfalls in pHSC mit resultierender Lyse bei hohen FFA-Konzentrationen gefunden (Daten nicht gezeigt). Dass speziell die pHSC VD<sub>2</sub> aufnehmen und konzentrationsabhängig metabolisieren, zeigte sich durch die Messung von 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub> mittels EIA. Auch die nachgewiesene Expression der wichtigsten 25-Hydroxylase – CYP2R1 (Lim *et al.*, 2012) – mittels qRT-PCR untermauerte die Fähigkeit der HSC zur Aufnahme und Metabolisierung von VD<sub>2</sub>. Die mehrfach beschriebene extrarenale in der Leber vorhandene Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase – CYP 27B1 (Putz-Bankuti *et al.*, 2012; Kazama *et al.*, 2010; Negrea *et al.*, 1995; Townsend *et al.*, 2005) – konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal speziell in pHSC hinsichtlich der Genexpression gezeigt werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die pHSC die Fähigkeit besitzen, das biologisch inaktive VD<sub>2</sub> in seine aktive Form umzuwandeln.

In *in vitro*-Untersuchungen zu FFA-Wirkungen in der NAFLD wurde das Augenmerk meistens auf deren Wirkungen in Hepatozyten gelegt (Bechmann *et al.*, 2012; Sydor *et al.*, 2013). Abergel *et al.* (2006) und Wobser *et al.* (2009) wiesen eine inhibitorische Wirkung von Palmitat auf die HSC-Proliferation und Expression von  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  nach. Auch Tsukamoto *et al.* (2005) beschrieb eine antifibrotische Wirkung von Fett auf HSC. Diese in früheren Studien gezeigten antifibrotischen FFA-Wirkungen wurden in dieser Arbeit überprüft. Des Weiteren dienten die *in vitro*-Experimente der genaueren Untersuchung molekularer Wirkungen, die bereits im NAFLD-Patientenkollektiv beobachtet worden waren.

Eine Behandlung von pHSC mit FFA schien bei alleiniger Betrachtung der mRNA-Expression eher antifibrotisch zu wirken, da die repräsentativen Fibrose-relevanten Parameter  $\alpha$ -SMA, Col1 $\alpha$  und TGF- $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle in unterschiedlichem Maße reduziert wurden. Diese in pHSC detektierte Reduktion der Genexpression von  $\alpha$ -SMA durch FFA spiegelt interessanterweise die verringerte  $\alpha$ -SMA-mRNA Expression bei NAFLD-Patienten wieder. Jedoch induzierte die Gabe von FFA in pHSC besonders nach 24 h eine gesteigerte  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression. Trotz der bei NAFLD-Patienten inhomogenen Expression des  $\alpha$ -SMA-Proteins im Western-Blot bestätigt das *in vitro*-Ergebnis die in der Immunhistochemie gezeigten Beobachtungen: der hier detektierte FFA-abhängige Anstieg des  $\alpha$ -SMA-Proteins steht im

Gegensatz zu Ergebnissen von Abergel *et al.* (2006) und Wobser *et al.* (2009), welche eine inhibitorische Wirkung von Palmitat auf die HSC-Proliferation und Expression von  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  zeigten. Diese durch Palmitat beschriebene Inhibition der Col1 $\alpha$ -Expression wurde auch durch Behandlung der pHSC mit einer FFA-Mischung aus Ölsäure und Palmitinsäure erzielt. Auch der durch FFA verursachte Proteinanstieg von TGF- $\beta$  auf das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h widerspricht der zuvor beschriebenen antifibrotischen FFA-Wirkung (Tsukamoto *et al.*, 2005; Abergel *et al.*, 2006; Wobser *et al.*, 2009). Diese differierenden Befunde für FFA auf den Aktivierungsstatus der HSC und der damit einhergehenden Expression Fibrose-relevanter Faktoren könnte auf die zusätzliche Anwesenheit von Ölsäure zurückführbar sein.

Die detektierten erhöhten MCP-1-Serumkonzentrationen bei NASH-Patienten wiesen auf eine Aktivierung der HSC hin, da das proinflammatorische Zytokin MCP-1 in der Leber primär von HSC synthetisiert wird (Wells *et al.*, 2006). Mit Hilfe der *in vitro*-Experimente an pHSC konnte nicht nur die Beteiligung von HSC an der MCP-1-Expression in der NAFLD, sondern auch die direkte Induktion dieses proinflammatorischen Zytokins durch FFA nachgewiesen werden. Die NASH-Studie in einem Rattenmodell von Boden *et al.* (2011), wie auch die Studie von Wobser *et al.* (2009) im humanen Zellkulturmodell, zeigten eine FFA-bedingte Steigerung von MCP-1 über die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass die bei der NASH beobachtete, charakteristische profibrogene Entwicklung durch direkte, FFA-induzierte Aktivierung der HSC hervorgerufen wird.

Die in der vorliegenden Arbeit und von Barchetta *et al.* (2012) berichtete, reduzierte VDR-Expression in einem NAFLD-Patientenkollektiv und die von Abramovitch *et al.* (2011) beobachtete, mit der HSC-Aktivierung und Transdifferenzierung in Myofibroblasten einhergehende Reduktion der VDR-Expression lassen auch in diesem *in vitro*-Experiment eine verminderte VDR-Expression durch FFA-Behandlung vermuten. Die alleinige Betrachtung der mRNA-Expression bestätigte diese Vermutung; jedoch stieg die Proteinmenge in Anwesenheit von FFA signifikant im Vergleich zur Kontrolle an. Dieses paradoxe Ergebnis weist darauf hin, dass die reduzierte VDR-Expression in den progredienten Verlauf der NAFLD nicht durch die Aktivierung der HSC über FFA hervorgerufen wird. Ferner scheinen andere Faktoren – z.B. VDR-Liganden, Hormone und Wachstumsfaktoren –, die sich während eines fibrogenen Prozesses verändern, einen Einfluss auf die Inhibition der VDR Expression auszuüben.



Die Auswirkungen von VD<sub>2</sub> auf die Expression Fibrose-relevanter Marker wurde sowohl in ausschließlich durch die Kultivierung bedingt aktivierten pHSC als auch in steatotischen pHSC überprüft. Dabei zeigte eine Behandlung mit VD<sub>2</sub> in kulturbedingt aktivierten pHSC in dem untersuchten Zeitraum eine inhibitorische Wirkung auf die mRNA-Expression von  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  und MCP1, welche jedoch nicht auf der Proteinebene nachweisbar war. Die von Abramovitch *et al.* (2011) in Ratten-HSC beschriebene Reduktion der Col1 $\alpha$ -Expression durch die Gabe von VD konnte hier in primären humanen HSC nicht untermauert werden. Dennoch bestätigt die hier unveränderte  $\alpha$ -SMA-Proteinexpression das von Abramovitch an Ratten-HSC gefundene Ergebnis. Trotz der fehlenden Col1 $\alpha$ -Modulation und unveränderten Proteinexpressionen scheint eine Involvierung des VDR durch die veränderte Genexpression stattzufinden, welche sich sowohl in einer gesteigerten mRNA- als auch Proteinexpression zeigte.

In steatotischen pHSC konnte eine Gabe von VD<sub>2</sub> keine Reduktion von  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  und MCP-1 bewirken, wie es bei kulturbedingt aktivierten Zellen der Fall war. Hier stieg sogar das  $\alpha$ -SMA gegenüber der Einzelbehandlung mit FFA signifikant an. Interessanterweise besaß VD<sub>2</sub> die Fähigkeit, die Col1 $\alpha$  mRNA Expression nach 24 h tendenziell zu verringern. Dies wurde ebenfalls von Kitson (2012) *in vitro* an HSC gezeigt. VD<sub>2</sub>-Wirkungen auf die Expression Fibrose-relevanter Marker waren ausschließlich auf die Genexpression beschränkt. Die von Nakano (2011) *in vivo* am NASH-Modell in Ratten nachgewiesene, inhibitorische Wirkung auf Inflammation und Fibrose konnte *in vitro* nicht an pHSC bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass die in der Studie von Nakano (2011) erzielte Inhibition der Fibrose nicht auf eine direkte antagonistische Wirkung von VD auf die FFA-bedingten Veränderungen in den HSC zurückgeführt werden kann.

Entgegen der von Wobser *et al.* (2009) und Abergel *et al.* (2006) postulierten antifibrotischen Wirkung der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure, zeigte sich die Kombination aus Ölsäure und Palmitinsäure eher profibrotisch, da bis auf Col1 $\alpha$  alle weiter untersuchten Fibrose-relevanten Parameter eine Induktion der Synthese aufwiesen. Trotz der direkten Wirkung von VD auf den FFA-Metabolismus und der NAFLD-Entwicklung (Barchetta *et al.*, 2011), wirkt VD<sub>2</sub> nicht direkt antagonistisch auf FFA-induzierte Veränderungen in der Expression Fibrose-relevanter Marker. Dies könnte an der differentiellen VDR-Expression zwischen der NAFLD-Patientenkohorte und den steatotischen pHSC liegen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die

VDR-Expression einen wichtigen Einfluss auf die durch VD-Supplementation beobachteten Wirkungen hat. Dies wird durch VDR-Knock-down bzw. Knock-out-Studien, in denen eine spontane Fibrose beobachtet wurde, untermauert (Ding *et al.*, 2013; Geier *et al.*, 2011). Ebenso wird diese Vermutung durch Untersuchungen an kanzerogenen Hepatozyten bestätigt, in denen die Vitamin D-VDR-Achse für die antiproliferative Wirkung essentiell war (Zuniga *et al.*, 2011, Fingas *et al.*, 2012).

Aufgrund der fehlenden Induktion der Col1 $\alpha$ -Expression durch FFA konnte eine mehrfach beschriebene inhibitorische Wirkung von VD hier leider nicht untersucht werden. Daher wurde in den anschließenden *in vitro*-Experimenten TGF- $\beta$  als potentester Stimulus der Fibrose eingesetzt.

#### **4.4 Auswirkungen von TGF- $\beta$ und VD<sub>2</sub> auf die Expression von VDR und Fibrose-relevante Marker in pHSC**

Die fehlende Induktion der Kollagen-Synthese und die zu geringe Aktivierung der pHSC durch FFA erforderte für eine genauere Analyse der Wirkung von VD<sub>2</sub> auf das Expressionsverhalten Fibrose-relevanter Marker einen potenteren Stimulus. In dieser Arbeit wurde daher das Zytokin TGF- $\beta$  verwendet. Dieses von steatotischen Hepatozyten sezernierte Zytokin (Sanyal *et al.*, 2004; Wobser *et al.*, 2009) triggert nicht nur die Hepatozyten-Apoptose (Kisseleva *et al.*, 2007) als Hauptmechanismus in der NAFLD, sondern wird zudem als zentraler Regulator in fibroproliferativen Änderungen verschiedener Organe – wie Lunge, Herz, Niere und Leber – angesehen (Liu *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2012; Dooley *et al.*, 2012; Baghy *et al.*, 2012). Dabei ist dieses pleiotrope Zytokin der potenteste Stimulus der HSC-Aktivierung – reflektiert durch eine vermehrte  $\alpha$ -SMA-Expression (Baghy *et al.*, 2012; Matsuzaki *et al.*, 2012; Pinzani *et al.*, 2010) und ECM-Synthese mit vorrangig Col1 $\alpha$ -Produktion (Madsen *et al.*, 2012; Tsukada *et al.*, 2005). Diese TGF- $\beta$ -stimulierende Wirkung konnte ebenfalls in den Konzentrations-Wirkungskurven der Fibrose-repräsentativen Marker TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA und Col1 $\alpha$  bestätigt werden, wobei keine Abhängigkeit von der exogenen TGF- $\beta$  Konzentration vorlag. Während die alleinige exogene TGF- $\beta$ -Stimulation konzentrationsunabhängig erschien, wurden trotzdem zwei Konzentrationen eingesetzt, um unterschiedliche exogene TGF- $\beta$ -Konzentrationen *in vitro* zu simulieren und deren Wirkung untersuchen zu können. Die Verwendung von TGF- $\beta$  für die nachfolgenden *in vitro*-Experimente gründete auf den in früheren *in vitro*-Studien gewonnenen Erkenntnissen. Diese beschrieben sowohl Interaktionen zwischen dem VDR-/Smad-Signalweg (Ding *et al.*, 2013; Potter *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2013; Daniel

*et al.*, 2007) als auch eine antagonistische Wirkung von VD auf die durch TGF- $\beta$  induzierten Zielgene (Halder *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2013; Potter *et al.*, 2013).

In dieser experimentellen Reihe zeigte sich eine Ätiologie-abhängige Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten. Besonders deutlich wurde dies im Expressionsverhalten Fibrose-relevanter mRNA durch die Stimulation der pHSC mit TGF- $\beta$  beobachtet. Daher war eine Subgruppierung der Gesamtgruppe nach Virus-unbelasteten sowie HBV- und HCV-belasteten pHSC vonnöten. Zusätzlich stellte sich ein Ätiologie-abhängiger zeitlicher Verlauf der Expression Fibrose-relevanter Marker heraus. Eine weitere Subdifferenzierung der einzelnen Gruppen bezüglich vorangegangener medikamentöser Therapien konnte vernachlässigt werden, da eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten beobachtet wurde. Eine ausgiebige Literaturrecherche zeigte, dass noch keine derartige vergleichende Studie vorgenommen wurde.

In früheren *in vitro*- und *in vivo*-Studien dokumentierte TGF- $\beta$  sein Potential, in HSC die Expression Fibrose-relevanter Marker wie Col1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  und  $\alpha$ -SMA zu induzieren (De Minicis *et al.*, 2007; Abramovitch *et al.*, 2011; Dooley *et al.*, 2000; Schnabl *et al.*, 2001). Bei der Betrachtung der hier gewonnen Col1 $\alpha$ -Daten durch exogenes TGF- $\beta$  muss der von Inagaki *et al.* (2001) und Dooley *et al.* (2001) beschriebene Effekt der Desensibilisierung von primär kultivierten HSC berücksichtigt werden, wodurch der Faktor der Expressionssteigerung wesentlich geringer ausfällt als in *in vivo*-Experimenten. Während sich keine wesentlichen Unterschiede der Col1 $\alpha$ -mRNA-Expression zeigten, stellte sich eine Ätiologie-abhängige Col1 $\alpha$ -Proteinexpression heraus. Dabei lag in der HBV-Gruppe eine tendenzielle Abhängigkeit von der verwendeten, exogenen TGF- $\beta$ -Konzentration und in der HCV-Gruppe eine tendenzielle zeitliche Abhängigkeit bei 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  vor. Neben Col1 $\alpha$  als Hauptkomponente der extrazellulären Matrix (Madson *et al.*, 2012) wurde Fibronectin ebenfalls in dieser Arbeit Gruppen-abhängig in seiner mRNA Expression induziert. Diese Beobachtung war in den Arbeiten von Friedman *et al.* (2008a) und Kawelke *et al.* (2011) ebenfalls nachgewiesen worden.

Entgegen den Ergebnissen von Abramovitch *et al.* (2011) und Knittel *et al.* (1996) wurde in der vorliegenden eine vermehrte  $\alpha$ -SMA-Expression durch TGF- $\beta$ -Einfluss detektiert, die sich mit den Ergebnissen von Ramirez *et al.* (2010), Dooley *et al.* (2000) und Lindert *et al.* (2005) deckt. Interessanterweise ergab die Betrachtung der einzelnen Gruppen ein deutlich verändertes mRNA-Expressionsmuster bei HCV im

Vergleich zu Virus-unbelasteten und HBV-belasteten pHSC. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Diskrepanz zwischen Virus-belasteten und Virus-unbelasteten pHSC auf Proteinebene: während im zeitlichen Verlauf die Expression des  $\alpha$ -SMA in Virus-freien pHSC sank, stieg seine Expression bei Anwesenheit eines Virus' an. Dies wurde auch von Gieseler *et al.* (2011) an LX2-Zellen nachgewiesen.

Die gesteigerte Synthese von endogenem TGF- $\beta$  (Dooley *et al.*, 2000) als weiterem Zeichen der HSC-Aktivierung wurde in dieser Arbeit ebenfalls nach Gabe von exogenem TGF- $\beta$  beobachtet: In allen untersuchten Gruppen induzierte es die endogene TGF- $\beta$ -Expression. Der einzige Unterschied zwischen den Gruppen wurde im zeitlichen Verlauf gesehen. Auch die PDGF-mRNA-Expression als potentestem Mitogen der Leberfibrose (De Minicis *et al.*, 2007) wurde in isolierten pHSC durch Stimulation der Zellen mit exogenem TGF- $\beta$  gesteigert; dabei wies das Expressionsprofil eine Virus-Abhängigkeit auf.

Die Analyse der infolge einer TGF- $\beta$ -Behandlung gesteigerten Expression der hier untersuchten repräsentativen Parameter ist ein guter Ansatzpunkt zum tieferen Verständnis der Pathogenese der Leberfibrose. Während *in vivo*-Studien (Abramovitch *et al.*, 2011, Barchetta *et al.*, 2012; NAFLD-Kohorte in dieser Arbeit) eine Reduktion des VDR verzeichneten, konnte Abramovitch *et al.* (2011) *in vitro* an Ratten-HSCs keine Änderungen hinsichtlich der VDR-Expression darstellen. Demgegenüber wurde bei den hier verwendeten pHSC durch TGF- $\beta$ -Behandlung die Expression des VDR Gruppen-abhängig sogar noch stärker als in FFA-stimulierten pHSC induziert. Dieser divergente Befund zeigt an, dass Ergebnisse an Ratten-HSCs nicht direkt auf humane HSC übertragbar sind. Außerdem lassen die Daten vermuten, dass die *in vivo* beobachteten Reduktionen des VDRs nicht auf die alleinige Wirkung von TGF- $\beta$  zurückzuführen sind. Durch dieses differente Verhalten des VDR liegt die Annahme nahe, dass Vitamin D eine wichtige Komponente des Pathomechanismus' der Leberfibrose ist. Bei der durch TGF- $\beta$  signifikant erhöhten VDR-Expression modulierte VD<sub>2</sub> tendenziell die TGF- $\beta$ -Wirkung. Vor allem in Virus-unbelasteten pHSC bewirkte VD<sub>2</sub> hinsichtlich der Genexpression eine tendenzielle Reduktion der TGF- $\beta$ -,  $\alpha$ -SMA- und PDGF-mRNA in mit 0,5 ng/mL TGF- $\beta$  stimulierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Interessanterweise wurden diese VD<sub>2</sub>-Effekte in Anwesenheit eines Virus' nicht gesehen. Tatsächlich wurde in der HCV-Gruppe sogar eine deutliche Zunahme der Col1 $\alpha$ -mRNA-Expression durch VD<sub>2</sub> beobachtet, welche sich jedoch auf Proteinebene nicht widerspiegelte. Des Weiteren wurde sowohl in Virus-freien als auch

HBV-belasteten pHSC hinsichtlich der Proteinexpression von Col1 $\alpha$  eine antagonisierende TGF- $\beta$ -Wirkung von VD<sub>2</sub> beobachtet. Diese Resultate decken sich mit Ergebnissen bei LX2-Zellen (Potter *et al.*, 2013), humanen Leiomyom-Zellen (Halder 2011 paper 0074), im NASH-Ratten-Modell (Nakano *et al.*, 2011) und im Lungenfibrosemodell (Ramirez *et al.*, 2010). Diese TGF- $\beta$ -antagonisierende Wirkung des VD<sub>2</sub> erforderte es, den Signalweg, über den diese Wirkung erzielt wurde, zu identifizieren. Aus früheren Studien war bekannt, dass TGF- $\beta$  unterschiedliche Signalwege induziert (Hanandez-Canaveral *et al.*, 2004; Nakao *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2003; Schnabl *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2012; Halder *et al.*, 2011), wobei die Stimulation des Smad-Signalweges eine entscheidende Rolle in der Modulation von Col1 $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA und TGF- $\beta$  spielt (Schnabl *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2012; Pinzani *et al.*, 2010). Dies konnte anhand der Inhibition des TGF- $\beta$ -Rezeptors auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Auswirkungen des VD<sub>2</sub> auf die Col1 $\alpha$ -Proteinexpression und die detektierte tendenzielle Inhibition des Smad-Signalweges in Form einer verminderten Smad2-Phosphorylierung lassen auf einen Zusammenhang schließen. Diese VD-inhibitorische Wirkung auf die Phosphorylierung von Smad wurde von Halder *et al.* (2011) ebenfalls in intrauterinen Tumorzellen beobachtet.

Die augenscheinlichen Widersprüche der VDR-Expression zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Studien erforderten eine genauere Untersuchung der VDR-Lokalisation innerhalb der Zelle. Diese fußte auf der von Peleg *et al.* (2010) und Allegretto *et al.* (1987) beschriebenen Degradation von zytosolischem VDR in Abwesenheit seines Liganden; es konnte gezeigt werden, dass die durch TGF- $\beta$ -Stimulation verursachte gesteigerte VDR-Expression zwischen Kern und Zytoplasma ausbalanciert ist. Eine Behandlung mit VD<sub>2</sub> verschob dieses Gleichgewicht zugunsten der Kernfraktion. Zu diesem Zeitpunkt liegt die Vermutung nahe, dass die *in vitro* gesteigerte VDR-Expression auf einen Fehlen der *in vivo* vorhandenen VDR-Degradation zurückzuführen ist.

Die *in vivo* deutlich beschriebenen inhibitorischen Wirkungen von VD auf die Leberfibrose konnten anhand der hier durchgeführten Experimentenreihe nicht vollständig geklärt werden. Beobachtete schwache VD<sub>2</sub>-Effekte können durch die mögliche kulturbedingte Voraktivierung der pHSC und/oder durch die Beständigkeit der VDR-Expression in den kultivierten Primärzellen erklärt werden. Daher könnte aufgrund der zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Situationen unterschiedlichen VDR-Expressionsraten

der Mangel an VDR eine bedeutende Rolle in der Progression der Leberfibrose spielen. Darüber hinaus konnte in dieser Studie eine Ätiologie-abhängige Wirkung von VD<sub>2</sub> hinsichtlich der Fibrose gezeigt werden. Diese differenten VD<sub>2</sub>-Wirkungen untermauern die Annahme der Involvierung multipler fibrogener Mechanismen durch Skoin *et al.* (2013).

#### **4.5 Auswirkungen einer VDR-Expressionsinhibition auf die Expression Fibrose-relevanter Faktoren in pHSC**

Sowohl in intrauterinen Tumorzellen (Halder *et al.*, 2011) als auch in HL-60-Zellen (Cao *et al.*, 2009) wurde eine Interaktion zwischen dem TGF- $\beta$  Signal, den Kennzeichen der Fibrogenese und dem VD-Metabolismus beschrieben, was durch die kürzlich von Ding *et al.* (2013) postulierte, enge genetische Interaktion zwischen VDR und dem TGF- $\beta$ -Signalweg unterstrichen wird. Angesichts dieser Erkenntnisse und der nur geringen VD<sub>2</sub>-Wirkungen bei gesteigerter VDR-Expression in TGF- $\beta$ -stimulierten pHSC wurden die Auswirkungen eines *in vivo* vorliegenden VDR-Mangels *in vitro* mittels siRNA-Transfektion hinsichtlich der Expression Fibrose-relevanter Marker getestet. Hierbei wurden ausschließlich Virus-unbelastete pHSCs verwendet, um mögliche virale Einflüsse auszuschließen.

Der Einsatz der VDR-siRNA-Transfektion bewirkte ein effektives *Knock-down* der VDR-Expression, welches auch durch TGF- $\beta$ -Stimulation nicht reversibel war. Dadurch konnte *in vitro* ein direkter Vergleich der TGF- $\beta$ -induzierten Fibrose in Abhängigkeit von der zellulären VDR-Expression erfolgen. Unabhängig von der zellulären VDR-Konzentration stieg die mRNA-Expression von TGF- $\beta$ , Col1 $\alpha$  und PDGF nach exogener TGF- $\beta$ -Stimulation der Zellen an. Jedoch wurde in der Proteinexpression bei einer geringen zellulären VDR-Konzentration eine deutlich stärkere Induktion der endogenen TGF- $\beta$ - und Col1 $\alpha$ -Synthese beobachtet. Des Weiteren führte eine exogene TGF- $\beta$ -Stimulation der Zellen zu einer VDR-konzentrationsabhängig gesteigerten Genexpression von  $\alpha$ -SMA und FN. Doch auch bei diesen Parametern verursachte eine reduzierte VDR-Expression eine stärkere TGF- $\beta$ -induzierte Gentranskription. Diese in WT-pHSC geringere  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression spiegelte sich in der Proteinexpression wieder. Dies ähnelt den von Zhang *et al.* (2010) in der renalen Fibrose und von Ding *et al.* (2013) in der Leberfibrose publizierten Daten an VDR *Knock-out*-Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen eine inverse Korrelation zwischen zellulärer VDR-Konzentration und TGF- $\beta$ /Smad-Signalwegaktivierung an. Die VDR-abhängige Aktivierung des Smad-Signalweges fand ohne Beteiligung einer

geänderten Expression der Inhibitoren Smurf2 und Smad7 statt. Die von Ding *et al.* (2013) beschriebene, VDR-beeinflussende Col1 $\alpha$ -mRNA-Expression durch die Inhibition der TGF- $\beta$ -induzierten Chromatinrestrukturierung der Smad3-Zielgene wurde nicht beobachtet. Ebenfalls kann die in der renalen Fibrose durch Ito *et al.* (2013) nachgewiesene Modulation des TGF- $\beta$ -Signalweges über die direkte Interaktion des VD-VDR-Komplexes mit Smad3 in dieser Arbeit, durch die fehlende Modulation der pSmad3-Expression eher ausgeschlossen werden. Auch die durch TGF- $\beta$  beschriebene Aktivierung des MAPkinase-Signalweges mit reaktiver Aktivierung des mitogenen Smad3-Signals (phospho Smad3L) (Matsuzaki *et al.*, 2012; Furukawa *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2005) kann durch die nicht veränderte Expression von pErk in diesen pHSC eher ausgeschlossen werden. Die Abweichung der Ergebnisse kann durch die Beobachtungen von Schnabl *et al.*, (2001) erklärt werden: so wurde hier gezeigt, dass TGF- $\beta$  für die HSC-Aktivierung und die Col1 $\alpha$ -Induktion benötigt wird, aber das für die maximale Col1 $\alpha$ -Expression die Aktivierung des Smad3-Protein erforderlich ist, welches sowohl TGF- $\beta$ -abhängig als auch -unabhängig wirkt. Des Weiteren lassen die veränderte  $\alpha$ -SMA-mRNA-Expression in diesen pHSC und die beschriebene Unabhängigkeit von Smad3 (Schnabl *et al.*, 2011) vermuten, dass die  $\alpha$ -SMA-Genexpression von Smad2 abhängig zu sein scheint. Die auf Proteinebene durch VDR-*Knock-down* bewirkte Steigerung der TGF- $\beta$ -induzierten fibrotischen Effekte in pHSC lassen sowohl eine VD-unabhängige VDR-Wirkung als auch einen Kontrollpunkt des TGF- $\beta$ -Signals vermuten. Neben den sehr deutlichen VD-unabhängigen VDR-Wirkungen auf die Expression Fibrose-relevanter Marker, konnte bei der Genexpression auch eine zelluläre VDR-konzentrationsabhängige VD<sub>2</sub>-Wirkung nachgewiesen werden.

Die ermittelten *in vitro*-Daten bezüglich der Expression profibrotischer Marker und VDR weisen auf die folgenden Rückschlussmöglichkeiten zur *in vivo*-Wirkung von VD und VDR hin:

1. Die in der Zellkultur durch TGF- $\beta$  gesteigerte VDR-Expression deutet an, dass *in vivo* nicht die Aktivierung der HSC mit der damit einhergehenden Fibrose für den VDR-Mangel in Patienten mit chronischer Lebererkrankung verantwortlich ist; vielmehr konnte die von Peleg *et al.* (2010) beschriebene VDR-Degradation aufgrund fehlender Ligandenbindung mit daraus folgender nukleärer Translokation in dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden. Dies zeigte sich a) *in vivo* in dem beobachteten VD-Mangel und der signifikant

reduzierten VDR-Expression mit parallel gesteigener VDR-Degradation und b) *in vitro* in der inhibierten, trypsinabhängigen VDR-Degradation aufgrund einer VD<sub>2</sub>-Behandlung.

2. Des Weiteren wiesen die *in vitro* antagonisierenden Wirkungen von VD<sub>2</sub> und VDR in der TGF- $\beta$ -induzierten Expression Fibrose-relevanter Marker darauf hin, dass der *in vivo* beobachtete Mangel an VD und VDR den Progress der Erkrankung fördern. Zusätzlich untermauern die Daten die schon bereits an kanzerogenen Hepatozyten beschriebene Hypothese (Zuniga *et al.*, 2011) der antifibrotischen Wirkung einer effektiven VD-VDR-Achse.

#### **4.6 Nicht-genomische Auswirkungen einer VD<sub>2</sub>-Behandlung in TGF- $\beta$ -stimulierten WT- und VDR-siRNA-transfizierten pHSC**

Eine inhibitorische Wirkung von VD auf die Fibrose in unterschiedlichen Organen (Abramovitch *et al.*, 2011; Makibayashi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010) wurde bereits gezeigt. Dabei wurde das Augenmerk aber auf die genomischen Wirkungen von VD nach Langzeitinkubationen gelegt. Neben der gering durch VD<sub>2</sub> veränderten Expression Fibrose-relevanter Marker konnte auch eine Interaktion zwischen VD<sub>2</sub> und dem TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg nach einer Langzeitbehandlung in dieser Studie beobachtet werden. Jedoch besitzt dieses Vitamin auch die Fähigkeit, durch Modulation der zellulären Signaltransduktion eine schnelle Zellantwort hervorzurufen (Lieberherr *et al.*, 1987; Lissos *et al.*, 1993; Dusso *et al.*, 2005; Campell *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit gezeigte VD-unabhängige Wirkung von VDR und die geringe Wirkung des VD<sub>2</sub> auf die Aktivierung des TGF/Smad-Signalweges in den Langzeituntersuchungen wurden zum ersten Mal auch hinsichtlich ihrer nicht-genomischen Wirkung untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei eine VDR-unabhängige antagonisierende Wirkung von VD<sub>2</sub> auf die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 ausschließlich innerhalb der ersten 30 Minuten. Diese inhibierenden VD<sub>2</sub>-Effekte wurden jedoch ausschließlich bei gleichzeitiger Zugabe von TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub> beobachtet. Ursachen der hier gezeigten Interaktionen zwischen VD<sub>2</sub> und TGF- $\beta$  könnten neben der Abhängigkeit von der Stimulationszeit auch die zelluläre Aufnahme und/oder die Bindung des VD<sub>2</sub> oder des TGF- $\beta$  sein. Auch in diesen Experimenten konnte eine Inhibition der Aktivierung des Smad-Signalweges durch eine Modulation der Inhibitoren ausgeschlossen werden. Dies lässt vermuten, dass VD<sub>2</sub> seine intrazelluläre Wirkung auf die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges entweder durch direkte Inhibition der Smad-Proteine oder indirekt über Bindung an Transmembranrezeptoren vermittelt.



In einer 2010 veröffentlichten Studie wurde die Identifikation des Membranrezeptors PDIA3 beschrieben, über den VD seine schnelle Antwort induzieren soll (Chen *et al.*, 2010). Chen *et al.* (2013) wies kürzlich sogar eine Interaktion zwischen PDIA3 und VDR auf Ebene der Genexpression und VD-Rezeptorbindung nach. Damit ist PDIA3 zumindest ein sehr guter Kandidat, dessen Rolle aber noch unabhängig verifiziert werden sollte. Auch sollte eine direkte Interaktion mit den Smad-Signalmolekülen überprüft werden, da sowohl Ding *et al.* (2013) in der Leberfibrose als auch Ito *et al.* (2013) in der renalen Fibrose solch eine Interaktion beschrieben.

#### **4.7 Auswirkungen der VDR-SNP auf das Expressionsverhalten Fibrose-relevanter Marker in pHSC**

Neben den in der vorliegenden Studie gezeigten Ätiologie-abhängigen Wirkungen von TGF- $\beta$  und VD<sub>2</sub> auf die Fibrose in pHSC scheinen VDR-Einzelnukleotid-Polymorphismen von wesentlicher Bedeutung zu sein. Die nachgewiesenen VDR-SNP im VDR-Genom wurden bereits durch mehrere Studien als differenzielle Einflussfaktoren im Krankheitsverlauf beschrieben (Li *et al.*, 2007; Falletti *et al.*, 2010; Adorini *et al.*, 2009). Daher lag die Vermutung nahe, dass neben dem ätiologischen Hintergrund und der zellulären VDR-Konzentration auch ein VDR-SNP das Expressionsverhalten hinsichtlich der Fibrose in pHSC beeinflussen könnte. Bis heute wurden keine *in vitro*-Untersuchungen hinsichtlich der Expression Fibrose-relevanter Marker in Abhängigkeit von den VDR-SNP durchgeführt. Zum ersten Mal konnte nun gezeigt werden, dass der VDR-SNP die TGF- $\beta$ - und VD<sub>2</sub>-Behandlung in pHSC beeinflusst. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung exemplarischer VDR-SNP – von denen sich drei in der Promotorregion (GATA-3, G-1520C und Cdx2), zwei in den Exonsequenzen (FokI und Taq<sup>a</sup>I) und vier in den Intronsequenzen (Ddel, Apal, Tru9I und BsmI) befanden (Falletti *et al.*, 2010; Uitterlinden *et al.*, 2004; Halsall *et al.*, 2005; Ochs-Balcon *et al.*, 2008) –, ließ sich für G-1520C, BsmI, Ddel und Taq<sup>a</sup>I eine Assoziation mit dem Expressionsverhalten verifizieren: dabei zeigte sich, dass vor allem die VDR-SNP BsmI (G/G), Ddel (G/G), Taqal (C/C) und das G-Allel im G-1520C mit einer erhöhten Col1 $\alpha$ -Expression assoziierten. Da durch die VDR-SNP-Analyse gezeigt werden konnte, dass die zelluläre Antwort auf eine VD<sub>2</sub>-Gabe in den hier verwendeten pHSC-Isolaten Genotyp-abhängig war, ergibt sich der Vorschlag, vor einer möglichen VD-Gabe zusätzlich zur Ätiologie auch den VDR-Genotyp zu bestimmen. Diese Empfehlung wird dadurch bestärkt, dass der

Genotyp BsmI (G/G) und das G-Allel des Ddel die Fibrose offenbar durch eine gesteigerte HSC-Aktivierung ( $\alpha$ -SMA) begünstigen.

Insbesondere für den VDR-SNP Ddel konnte die in den VDR siRNA-Untersuchungen nachgewiesene Assoziation zwischen der VDR-Expression und der endogenen TGF- $\beta$ -Synthese untermauert werden. Hierbei zeigte sich im Genotyp Ddel (C/C) eine Assoziation zwischen fehlender Induktion der VDR-Expression und gesteigerter endogener TGF- $\beta$ -Synthese.

Die *in vitro* beobachteten Effekte lassen vermuten, dass eine VDR-SNP-Bestimmung einen prädiktiven Wert für die Identifikation von Respondern für die positiven Effekte einer VD-Supplementierung bei einer chronischen Lebererkrankung haben könnte. Um diese begründete Annahme zu verifizieren, müssen Untersuchungen an größeren Kollektiven erfolgen und anschließend in einem *in vivo*-Modell überprüft werden.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Pathomechanismus der Leberfibrose als gemeinsame Endstrecke der chronischen Lebererkrankungen eindeutig durch Störungen in der VD-VDR-Achse der Hepatischen Sternzellen begünstigt wird. So wurde *in vitro* nachgewiesen, dass VD nicht nur die Degradation des VDRs verhindert, sondern auch antagonistisch auf die Genexpression Fibrose-relevanter Marker wirkt. Dabei deuteten die hier erstmals durchgeführten Analysen der VDR-SNP im obigen Kontext darauf hin, dass neben der Ätiologie auch die Gensequenz des VDRs die Fibrose-inhibierende Wirkung des VD beeinflusst. Während in Kurzzeitstudien eine VDR-unabhängige Inhibition des TGF- $\beta$ -induzierten Smad-Signalweges nachgewiesen wurde, konnte in Langzeitstudien VDR VD-unabhängig für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden. Dies suggeriert synergistische Effekte von VDR und VD in der Protektion der Fibrose durch die Inhibition des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges. Bekräftigt wird diese Schlussfolgerung durch die stärkere Expression Fibrose-relevanter Marker durch eine suffiziente VDR-Inhibition mittels VDR-siRNA. Die Dysbalance der VD-VDR-Achse bei NAFLD-Patienten konnte somit als weiterer Mechanismus in der Pathogenese der chronischen Lebererkrankung identifiziert werden.

#### **4.8 Limitationen der *in-vitro*-Studie**

- Untersuchungen an isolierten, ruhenden pHSC konnten aufgrund technischer Limitationen nicht durchgeführt werden.

- Eine weitere Limitation der Untersuchungen lag in der Reinheit isolierter pHSCs. Eine 100%ige Reinheit konnte auf der mRNA-Ebene nicht ermittelt werden, da sich eine geringfügige Verunreinigung mit anderen Leberzellen detektieren lies; jedoch wurden immunzytochemisch keine spezifischen Marker anderer Leberzellen in der HSC-Population nachgewiesen.
- Grundsätzlich muss darauf hingewiesen werden, dass sich *in vitro* und *in vivo* aktivierte HSC nur teilweise in ihren aktivierungsassoziierten Faktoren überlappen (De Minicis *et al.*, 2007); daher müssen über *in vitro*-Studien ermittelte Daten und Schlussfolgerungen immer kritisch hinterfragt werden.

## 4.9 Ausblick

Der Pathomechanismus der Leberfibrose als gemeinsame Endstrecke aller chronischen Lebererkrankungen ist nicht vollständig geklärt. Die logische Kosequenz ist, dass noch keine kausale Therapie der Leberfibrose verfügbar ist. Somit muss die Lebertransplantation als letzte Therapieoption gewählt werden. Dieser *Status quo* zeigt die Notwendigkeit auf, sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien massiv voran zu treiben, um mittel- bis langfristig potente interventionelle und möglicherweise sogar kausale Therapien entwickeln zu können. Die Dringlichkeit dieser Perspektive wird auch gerade vor dem Hintergrund des chronischen Organmangels deutlich. Zusätzlich sollte im Sinne individualisierter therapeutischer Ansätze die genetischen Variationen des oder der Angriffspunkte einer Therapie berücksichtigt werden, um die mögliche Nebenwirkungsrate und das Therapieversagen möglichst gering zu halten.

Die in den NAFLD-Patienten beobachtete Störung der VD-VDR-Achse und die in den *in vitro*-Untersuchungen bestätigten antagonisierende Wirkung der VD-VDR-Achse auf die Fibrose verlangen weitere intensivere molekularbiologische Untersuchungen der VD-Wirkung auf die chronischen Lebererkrankungen. *In vitro*-Studien sollten möglichst nur mit humanen HSC erfolgen, da sich die HSC-Antworten auf TGF- $\beta$  und VD deutlich von tierischen HSC unterscheiden.

Anhand der hier ermittelten Ergebnisse scheint das physiologisch vorkommende VD bei chronischen Lebererkrankungen therapeutisch zu wirken. In wiefern sich eine Supplementation bei festgestelltem VD-Mangel positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt, muss durch weitere *in vitro*- und *in vivo*-Studien – letztendlich aber auch in einer klinischen Studie – geklärt werden. Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk der TGF- $\beta$ -induzierten Fibrose und dem zugehörigen Smad-Signalweg galt, sollten

zwecks Erlangung eines tieferen Verständnisses der VD- und VDR-Wirkung weitere potentiell involvierte Pathomechanismen, wie z.B. die Rolle von PDGF in der Stimulation der Leberfibrose, ebenfalls überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist mit ihrer steigenden Inzidenz in Ländern mit westlichem Lebensstil die Hauptursache chronischer Lebererkrankungen und wird in den nächsten Dekaden die Hauptursache für Lebertransplantationen sein. Alle chronisch verlaufenden Lebererkrankungen weisen in ihrem progressiven Verlauf eine Leberfibrose auf. Der bis heute nicht vollständig geklärte Pathomechanismus der Leberfibrose ist dafür verantwortlich, dass uns keine effektive kausale Therapie zur Verfügung steht. Um eine Lebertransplantation als letzte Therapieoption verhindern zu können, ist es daher von immenser Bedeutung, den Pathomechanismus der Leberfibrose aufzuklären, um alternative Behandlungsoptionen entwickeln zu können.

Erste Beobachtungen anderer Untersucher zu einer inversen Korrelation des Vitamins D (VD) bzw. des Vitamin D Rezeptors (VDR) mit dem Schweregrad einer NAFLD wiesen darauf hin, dass eine gestörte VD-VDR-Achse in die Progression dieser Lebererkrankung involviert sein könnte. Zur Bestätigung wurde in der vorliegenden Arbeit ein NAFLD-Patientenkollektiv hinsichtlich der mit dem Krankheitsverlauf einher gehenden fibrotischen Veränderungen, des VD-Status' und der VDR-Expression analysiert. Die in diesem Patientenkollektiv gefundenen reduzierten VD-Serumkonzentrationen und Expressionsraten des Gesamtlängen-Proteins VDR bestätigten die Assoziation zwischen VD- bzw. VDR-Mangel und NAFLD, zeigten aber keine Korrelation mit dem Schweregrad. Des Weiteren zeigte sich in dieser Patientengruppe eine gesteigerte VDR-Degradation. Zur Abklärung der Involvierung von VD und VDR im Krankheitsverlauf wurde *in vitro* durch die Stimulation primärer humaner Hepatischer Sternzellen (phHSC) mit TGF- $\beta$  eine Fibrose imitiert. Der VDR-Ligand VD<sub>2</sub> hatte Ätiologie-abhängig eine tendenziell antagonisierende Wirkung auf die Expression profibrotischer Gene in phHSC bei nicht reduzierter VDR-Expression. Die Inhibition der zellulären VDR-Konzentration mittels VDR-siRNA-Transfektion förderte die Expression Fibrose-relevanter Gene unabhängig von VD<sub>2</sub>. Diese Wirkungen von VD und VDR auf die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivierung der phHSC konnten auf eine zeitlich zwischen VD<sub>2</sub> und dem VDR differierende Inhibition des TGF- $\beta$ / Smad-Signalweges zurückgeführt werden. Diese Hemmung wurde unabhängig vom jeweiligen Interaktionspartner erzielt. Die in NAFLD-Patienten bei VD-Mangel gesteigerte VDR-Degradation konnte durch die *in vitro* nachgewiesene, protektive Wirkung von VD<sub>2</sub> auf die VDR-Degradation erklärt

werden. Darüber hinaus wurde gefunden, dass die VDR-Einzelnukleotid-Polymorphismen G-1520C, BsmI, Ddel und Taq<sup>AI</sup> sowohl den Progress der Leberfibrose beeinflussen als auch das Ansprechen auf eine VD<sub>2</sub>-Behandlung prognostizieren.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass eine VD-Supplementation aufgrund ihrer protektiven Wirkung auf die VDR-Degradation und ihrer inhibierenden Wirkung auf die TGF- $\beta$ -induzierte Fibrose in pHSC eine mögliche neue Therapieoption für die Leberfibrose darstellen könnte, wobei der individuelle VDR-Einzelnukleotid-Polymorphismus beachtet werden sollte.

## Summary

Both non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most common liver disease in countries with a Westernized lifestyle, and all other chronic liver diseases exhibit liver fibrosis in their terminal stages. As the pathomechanism of liver fibrosis to date is only incompletely understood, there is a lack of in effective and potentially causal therapies. In order to avoid liver transplantation as the terminal therapeutic option, it is thus imperative to elucidate the pathomechanism of liver fibrosis so as to be able to develop alternative treatment options.

First observations by other investigators on an inverse correlation between vitamin D (VD) or the vitamin D receptor (VDR), respectively, and the severity of NAFLD indicated a role for a dysfunctional VD-VDR axis in the progression of this liver disease. For verification, a NAFLD patient cohort was analyzed as to the patients' fibrotic changes, VD status and VDR expression as correlated with disease progression. While the reduced serum levels of VD and the expression rates of full-length VDR confirmed their association with the deficiencies in both VD and VDR and NAFLD, they did not show an inverse correlation with the severity of NAFLD. In addition, this patient group revealed an increased VDR degradation. In order to clarify the involvement of VD and VDR in the progression of disease, primary human hepatic stellate cells (pHSC) were stimulated with by TGF- $\beta$  *in vitro* so as to mimic a fibrotic process. In an etiology-dependent manner, the treatment of pHSC with the CDR ligand VD<sub>2</sub> (with vs. without TGF- $\beta$  stimulation) showed a tendency towards reduced expression of profibrotic genes in these cells, but no reduction of VDR expression. The inhibition of the cellular VDR concentration *via* VDR siRNA transfection supported the expression of genes relevant in fibrosis independently of

VD<sub>2</sub>. Profibrogenic gene expression was induced by TGF- $\beta$  *via* the Smad signalling pathway. Interestingly, treatment with VD<sub>2</sub> caused a rapid inhibition of the TGF- $\beta$ /Smad signalling pathway, which occurred independently from the cellular VDR concentration. In contrast, VDR knock-down influenced the TGF- $\beta$ /Smad signalling pathway after 24 h independent from VD<sub>2</sub>. These facts suggested an interaction of both VD and VDR. VDR degradation enhanced in NAFLD patients upon VD deficiency could be explained by the protective effect of VD<sub>2</sub> on the VDR degradation as was seen *in vitro*. In addition, it was found that the VDR single nucleotide polymorphisms G-1520C, BsmI, DdeI and Taq<sup>a</sup>I influence the progression of liver fibrosis as well as predict the response to as treatment with VD<sub>2</sub>.

In conclusion, the protective effect of VD supplementation VDR degradation as well as its inhibitory effect on the TGF- $\beta$ -induced fibrosis in pHSC may offer novel therapeutic options for treating liver fibrosis. Importantly, the therapeutic effect of VD-supplementation may depend on individual VDR single nucleotide polymorphisms.

## 6 Literatur

- Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, et al. 1981. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4990-4
- Abergel A, Sapin V, Dif N, Chassard C, Darcha C, et al. 2006. Growth arrest and decrease of alpha-SMA and type I collagen expression by palmitic acid in the rat hepatic stellate cell line PAV-1. *Dig Dis Sci* 51: 986-95
- Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, et al. 2011. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut* 60: 1728-37
- Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. 2011. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naive patients. *World J Gastroenterol* 17: 5184-90
- Adams LA, Feldstein AE. 2011. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis* 12: 10-6
- Adorini L. 2009. Vitamin D receptor polymorphisms in primary biliary cirrhosis: a functional connection? *J Hepatol* 50: 1071-3
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, et al. 2005. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*
- Alkhoury N, Carter-Kent C, Feldstein AE. 2011. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5: 201-12
- Allegretto EA, Pike JW, Haussler MR. 1987. Immunochemical detection of unique proteolytic fragments of the chick 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor. Distinct 20-kDa DNA-binding and 45-kDa hormone-binding species. *J Biol Chem* 262: 1312-9
- Anty R, Lemoine M. 2011. Liver fibrogenesis and metabolic factors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35 Suppl 1: S10-20
- Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, et al. 2001. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 16: 1256-64



- Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. 2012. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem* 60: 262-8
- Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, et al. 1988. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3294-8
- Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, et al. 2011. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 9: 85
- Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, et al. 2012. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology* 56: 2180-7
- Battaller R, Brenner DA. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-18
- Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. 2002. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 76: 750-7
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 56: 952-64
- Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa JP, Sydor S, Best J, et al. 2013. Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 57: 1394-406
- Bian Z, Ma X. 2012. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Front Physiol* 3: 248
- Bikle DD. 2010. Vitamin D: an ancient hormone. *Exp Dermatol* 20: 7-13
- Bitetto D, Fabris C, Falletti E, Fornasiere E, Fumolo E, et al. 2010. Vitamin D and the risk of acute allograft rejection following human liver transplantation. *Liver Int* 30: 417-44
- Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, et al. 2011. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transpl Int* 24: 43-50

- Boden G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 139-43
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126: 789-99
- Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ. 2012. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In Zakim and Boyer's *Hepatology: A Textbook of liver disease*, ed. DC Rockey, SL Friedman: Elsevier Inc.
- Campbell FC, Xu H, El-Tanani M, Crowe P, Bingham V. 2010. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control. *Biochem Pharmacol* 79: 1-9
- Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, et al. 2003a. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38: 1188-98
- Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. 2003b. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83: 655-63
- Cao H, Yu J, Xu W, Jia X, Yang J, et al. 2009. Proteomic analysis of regenerating mouse liver following 50% partial hepatectomy. *Proteome Sci* 7: 48
- Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. 2005. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J* 19: 136-8
- Chen J, Doroudi M, Cheung J, Grozier AL, Schwartz Z, Boyan BD. 2013. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Cell Signal* 25: 2362-73
- Chen J, Olivares-Navarrete R, Wang Y, Herman TR, Boyan BD, Schwartz Z. 2010. Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in osteoblasts. *J Biol Chem* 285: 37041-50
- Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, et al. 2010. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes* 59: 242-8

- Chiang KC, Chen TC. 2009. Vitamin D for the prevention and treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 15: 3349-54
- Dalhoff K, Dancey J, Astrup L, Skovsgaard T, Hamberg KJ, et al. 2003. A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 89: 252-7
- Daniel C, Schroder O, Zahn N, Gaschott T, Steinhilber D, Stein JM. 2007. The TGFbeta/Smad 3-signaling pathway is involved in butyrate-mediated vitamin D receptor (VDR)-expression. *J Cell Biochem* 102: 1420-31
- Das SK, Vasudevan DM. 2008. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest* 68: 260-9
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, et al. 2007. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132: 1937-46
- Dechene A, Sowa JP, Gieseler RK, Jochum C, Bechmann LP, et al. 2010. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 52: 1008-16
- Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, et al. 2013. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell* 153: 601-13
- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. 2000. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 31: 1094-106
- Dooley S, ten Dijke P. 2012. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347: 245-56
- Drenckhahn D, Zenker W. 1994. Benninghoff Anatomie
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. 2005. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8-28
- Ertle J, Dechene A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, et al. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer* 128: 2436-43

- Falleti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fontanini E, et al. 2010. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 16: 3016-24
- Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. 1989. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res* 17: 2150
- Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. 2008. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat Rec (Hoboken)* 291: 684-92
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, et al. 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40: 185-94
- Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. 2009. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 50: 1072-8
- Fickert P, Trauner M. 2010. Nichtalkoholische Fettlebererkrankung NAFLD-Die Lebererkrankung des 21. Jahrhunderts? *Der Mediziner* 4: 24-8
- Fingas CD, Altinbas A, Schlattjan M, Beilfuss A, Sowa JP, et al. 2013. Expression of apoptosis- and vitamin D pathway-related genes in hepatocellular carcinoma. *Digestion* 87: 176-81
- Friedman SL. 2008a. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 254: 120-9
- Friedman SL. 2008b. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88: 125-72
- Fujii H, Kawada N. 2012. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47: 215-25
- Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, et al. 2003. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 38: 879-89
- Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, et al. 2011. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 54: 1570-9

- Garcia-Monzon C, Lo Iacono O, Mayoral R, Gonzalez-Rodriguez A, Miquilena-Colina ME, et al. 2011. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 54: 142-52
- Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, Nanci A. 2003. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology* 37: 1034-42
- Geerts A, Vrijssen R, Rauterberg J, Burt A, Schellinck P, Wisse E. 1989. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol* 9: 59-68
- Geier A. 2011. Shedding new light on vitamin D and fatty liver disease. *J Hepatol* 55: 273-5
- Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. 2008. Advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2: 803-16
- Gieseler RK, Marquitan G, Schlattjan M, Sowa JP, Bechmann LP, et al. 2010. Hepatocyte apoptotic bodies encasing nonstructural HCV proteins amplify hepatic stellate cell activation: implications for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 18: 760-7
- Gieseler RK, Rober RA, Kuhn R, Weber K, Osborn M, Peters JH. 1991. Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions in vitro belong to the myeloid lineage. *Eur J Cell Biol* 54: 171-81
- Gieseler RK, Xu H, Schlemminger R, Peters JH. 1993. Serum-free differentiation of rat and human dendritic cells, accompanied by acquisition of the nuclear lamins A/C as differentiation markers. *Adv Exp Med Biol* 329: 287-91
- Gines P, Fernandez J, Durand F, Saliba F. 2012. Management of critically-ill cirrhotic patients. *J Hepatol* 56 Suppl 1: S13-24
- Gomez-Ramirez J, Martin-Perez E, Amat CG, Sanz IG, Bermejo E, et al. 2010. [Influence of pre-surgical chemotherapy on liver parenchyma and post-surgical outcome of patients subjected to hepatectomy due to colorectal carcinoma metastases]. *Cir Esp* 88: 404-12

- Grant WB, Holick MF. 2005. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 10: 94-111
- Gressner OA, Lahme B, Gressner AM. 2008. Gc-globulin (vitamin D binding protein) is synthesized and secreted by hepatocytes and internalized by hepatic stellate cells through Ca(2+)-dependent interaction with the megalin/gp330 receptor. *Clin Chim Acta* 390: 28-37
- Gruber HE, Hoelscher G, Ingram JA, Chow Y, Loeffler B, Hanley EN, Jr. 2008. 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> inhibits proliferation and decreases production of monocyte chemoattractant protein-1, thrombopoietin, VEGF, and angiogenin by human annulus cells in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)* 33: 755-65
- Grunhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Hoblinger A, Obermayer-Pietsch B, et al. 2012. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology* 56: 1883-91
- Hafeez S, Ahmed MH. 2013. Bariatric surgery as potential treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a future treatment by choice or by chance? *J Obes* 2013: 839275
- Halder SK, Goodwin JS, Al-Hendy A. 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reduces TGF-beta3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E754-62
- Halmos B, Szalay F, Cserniczky T, Nemesanszky E, Lakatos P, et al. 2000. Association of primary biliary cirrhosis with vitamin D receptor BsmI genotype polymorphism in a Hungarian population. *Dig Dis Sci* 45: 1091-5
- Halsall JA, Osborne JE, Epstein MP, Pringle JH, Hutchinson PE. 2009. The unfavorable effect of the A allele of the vitamin D receptor promoter polymorphism A-1012G has different mechanisms related to susceptibility and outcome of malignant melanoma. *Dermatoendocrinol* 1: 54-7
- Halsall JA, Osborne JE, Potter L, Pringle JH, Hutchinson PE. 2004. A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer* 91: 765-70

- Halsall JA, Osborne JE, Pringle JH, Hutchinson PE. 2005. Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism, are associated with vitamin D<sub>3</sub> responsiveness and non-familial susceptibility in psoriasis. *Pharmacogenet Genomics* 15: 349-55
- Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, et al. 2008. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* 66: S98-112
- Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25: 543-59
- Henderson NC, Iredale JP. 2007. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 112: 265-80
- Hernandez-Canaveral I, Gonzalez J, Lopez-Casillas F, Armendariz-Borunda J. 2004. Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 380-7
- Hernandez-Gea V, Friedman SL. 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 6: 425-56
- Holick MF. 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80: 1678S-88S
- Holick MF. 2007. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357: 266-81
- Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. 2001. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358: 1500-3
- Inagaki Y, Higashiyama R, Higashi K. 2012. Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27 Suppl 2: 85-8
- Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, et al. 2001. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 187: 117-23

- Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, et al. 2013. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J Clin Invest* 123: 4579-94
- Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. 2012. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 27 Suppl 2: 65-8
- Jiang W, Zhang Y, Wu H, Zhang X, Gan H, et al. 2010. Role of cross-talk between the Smad2 and MAPK pathways in TGF-beta1-induced collagen IV expression in mesangial cells. *Int J Mol Med* 26: 571-6
- Jiao J, Friedman SL, Aloman C. 2009. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 223-9
- Junqueira LC, Carneiro J. 1996. *Histologie*
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, et al. 1999. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 276: G1059-68
- Katz K, Brar PC, Parekh N, Liu YH, Weitzman M. 2010. Suspected nonalcoholic Fatty liver disease is not associated with vitamin d status in adolescents after adjustment for obesity. *J Obes* 2010: 496829
- Kawelke N, Vasel M, Sens C, Au A, Dooley S, Nakchbandi IA. 2011. Fibronectin protects from excessive liver fibrosis by modulating the availability of and responsiveness of stellate cells to active TGF-beta. *PLoS One* 6: e28181
- Kazama JJ, Yamamoto T, Oya H, Yamamoto S, Sato Y, et al. 2010. A patient with severe hypercalcemia in multiple organ dysfunction syndrome: role of elevated circulating 1alpha,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D levels. *J Bone Miner Res* 25: 1455-9
- Kisseleva T, Brenner DA. 2007. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S73-8
- Kitson MT, Roberts SK. 2012. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol* 57: 897-909
- Knittel T, Janneck T, Muller L, Fellmer P, Ramadori G. 1996. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology* 24: 352-60
- Kopec KL, Burns D. 2011. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy. *Nutr Clin Pract* 26: 565-76



- Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. 2013. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology* 58: 1166-74
- Li F, Zeng B, Chai Y, Cai P, Fan C, Cheng T. 2009. The linker region of Smad2 mediates TGF-beta-dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 289-93
- Li H, Stampfer MJ, Hollis JB, Mucci LA, Gaziano JM, et al. 2007. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Med* 4: e103
- Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. 2008. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 43: 419-28
- Lieberherr M. 1987. Effects of vitamin D3 metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem* 262: 13168-73
- Lim LY, Chalasani N. 2012. Vitamin d deficiency in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep* 14: 67-73
- Lindert S, Wickert L, Sawitza I, Wiercinska E, Gressner AM, et al. 2005. Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biol* 24: 198-207
- Lissoos TW, Beno DW, Davis BH. 1993. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 activates Raf kinase and Raf perinuclear translocation via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 268: 25132-8
- Liu X, Hu H, Yin JQ. 2006. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 26: 8-22
- Lv Z, Xu L. 2012. Salvianolic Acid B Inhibits ERK and p38 MAPK Signaling in TGF-beta1-Stimulated Human Hepatic Stellate Cell Line (LX-2) via Distinct Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 960128
- Madsen DH, Jurgensen HJ, Ingvarsen S, Melander MC, Vainer B, et al. 2012. Endocytic collagen degradation: a novel mechanism involved in protection against liver fibrosis. *J Pathol* 227: 94-105
- Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, Fukushima N, Kusano K, et al. 2001. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am J Pathol* 158: 1733-41

- Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, et al. 2012. 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 56: 1231-9
- Matsuzaki K. 2012. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell Tissue Res* 347: 225-43
- Miroliaee A, Nasiri-Toosi M, Khalilzadeh O, Esteghamati A, Abdollahi A, Mazlouni M. 2010. Disturbances of parathyroid hormone-vitamin D axis in non-cholestatic chronic liver disease: a cross-sectional study. *Hepatol Int* 4: 634-40
- Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, et al. 1997. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 11: 1165-79
- Mormone E, George J, Nieto N. 2011. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 193: 225-31
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, et al. 1994. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367: 284-7
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. 1992. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6665-9
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, et al. 2004. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62: 60-5
- Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, et al. 2011. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 55: 415-25
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, et al. 1997. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J* 16: 5353-62
- Negrea LA, Slatopolsky E, Dusso AS. 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D synthesis in rat liver microsomes. *Horm Metab Res* 27: 461-4
- Nimer A, Mouch A. 2012. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naive patients. *World J Gastroenterol* 18: 800-5

- Niu L, Wang X, Li J, Huang Y, Yang Z, et al. 2007. Leptin stimulates alpha1(I) collagen expression in human hepatic stellate cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway. *Liver Int* 27: 1265-72
- Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC, Elston RC, et al. 2008. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. *Carcinogenesis* 29: 1788-93
- Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, et al. 2011. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 46: 101-7
- Peleg S, Nguyen CV. 2010. The importance of nuclear import in protection of the vitamin D receptor from polyubiquitination and proteasome-mediated degradation. *J Cell Biochem* 110: 926-34
- Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. 1996. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 17: 273-8
- Pike JW, Meyer MB, Bishop KA. 2012. Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor - an update on mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord* 13: 45-55
- Pike JW, Meyer MB, Martowicz ML, Bishop KA, Lee SM, et al. 2010. Emerging regulatory paradigms for control of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 130-5
- Pinzani M. 1999. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 21: 475-90
- Pinzani M, Macias-Barragan J. 2010. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4: 459-72
- Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. 2007. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2017-29
- Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 2012. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int* 33: 677-86
- Putz-Bankuti C, Pilz S, Stojakovic T, Scharnagl H, Pieber TR, et al. 2012. Association of 25-hydroxyvitamin D levels with liver dysfunction and mortality in chronic liver disease. *Liver Int* 32: 845-51

- Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, Steinmeyer A, Zugel U, Roman J. 2010. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118: 142-50
- Rashid ST, Humphries JD, Byron A, Dhar A, Askari JA, et al. 2012. Proteomic analysis of extracellular matrix from the hepatic stellate cell line LX-2 identifies CYR61 and Wnt-5a as novel constituents of fibrotic liver. *J Proteome Res* 11: 4052-64
- Reddy GS, Tserng KY. 1989. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry* 28: 1763-9
- Rhee EJ, Kim MK, Park SE, Park CY, Baek KH, et al. 2013. High serum vitamin D levels reduce the risk for nonalcoholic fatty liver disease in healthy men independent of metabolic syndrome. *Endocr J* 60: 743-52
- Rombouts K, Marra F. 2010. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 28: 229-35
- Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. 1971. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest* 50: 679-87
- Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, et al. 2011. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 55: 1103-11
- Sanyal AJ. 2005. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 46-53
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. 2001. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 34: 89-100
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700
- Skoien R, Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, et al. 2013. Heterogeneity of fibrosis patterns in non-alcoholic fatty liver disease supports the presence of multiple fibrogenic pathways. *Liver Int* 33: 624-32

- Starkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, et al. 2003. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 39: 538-46
- Sundaram S, Sea A, Feldman S, Strawbridge R, Hoopes PJ, et al. 2003. The combination of a potent vitamin D3 analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 9: 2350-6
- Sydor S, Gu Y, Schlattjan M, Bechmann LP, Rauen U, et al. 2013. Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest* 93: 20-30
- Takeshita A, Imai K, Kato S, Kitano S, Hanazawa S. 1998. 1alpha,25-dehydroxyvitamin D3 synergism toward transforming growth factor-beta1-induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *J Biol Chem* 273: 14738-44
- Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Kikuchi K, Shibuya A, et al. 2009. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with increased susceptibility to primary biliary cirrhosis in Japanese and Italian populations. *J Hepatol* 50: 1202-9
- Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, et al. 1982. 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem J* 204: 713-9
- Tang LX, He RH, Yang G, Tan JJ, Zhou L, et al. 2012. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PLoS One* 7: e31350
- Tolman KG, Dalpiaz AS. 2007. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ther Clin Risk Manag* 3: 1153-63
- Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. 2005. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 103-9
- Tsiaras WG, Weinstock MA. 2011. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 91: 115-24

- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 364: 33-60
- Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. 2005. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 280: 10055-64
- Tsukamoto H. 2005. Fat paradox in liver disease. *Keio J Med* 54: 190-2
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338: 143-56
- Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G. 2010. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 42: 320-30
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51
- Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. 2002. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology* 35: 126-31
- Wells RG. 2006. Mechanisms of liver fibrosis: New insights into an old problem. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 3: 489-95
- White JH. 2012. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Rev Endocr Metab Disord* 13: 21-9
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. 2008. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 20: 68-74
- Wjst M. 2005. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet* 6: 2
- Wobser H, Dorn C, Weiss TS, Amann T, Bollheimer C, et al. 2009. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell Res* 19: 996-1005
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. 2000. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72: 690-3

- Wu CC, Chang JH, Chen CC, Su SB, Yang LK, et al. 2011. Calcitriol treatment attenuates inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J Exp Med* 223: 153-9
- Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH. 1993. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand J Immunol* 38: 535-40
- Yang L, Ma J, Zhang X, Fan Y, Wang L. 2012. Protective role of the vitamin D receptor. *Cell Immunol* 279: 160-6
- Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, et al. 2007. Comprehensive analysis of the effects of ordinary nutrients on hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2016-27
- Yata Y, Scanga A, Gillan A, Yang L, Reif S, et al. 2003. DNase I-hypersensitive sites enhance alpha1(I) collagen gene expression in hepatic stellate cells. *Hepatology* 37: 267-76
- Ye WZ, Reis AF, Velho G. 2000. Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J Hum Genet* 45: 56-7
- Yilmaz Y. 2012. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and osteoporosis--clinical and molecular crosstalk. *Aliment Pharmacol Ther* 36: 345-52
- Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X, Ling W. 2012. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur J Clin Invest* 42: 1189-96
- Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, Martikainen P, Miettinen S, et al. 2002. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm* 64: 357-406
- Yoshida K, Matsuzaki K. 2012. Differential Regulation of TGF-beta/Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Front Physiol* 3: 53
- Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, et al. 2005. Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* 166: 1029-39

- Zarrabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Olmos JM, Gonzalez-Macias J. 1992. Effect of calcitriol on the secretion of prostaglandin E2, interleukin 1, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Bone* 13: 185-9
- Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. 2011. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 17: 3377-89
- Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC. 2010. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 21: 966-73
- Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF. 1994. Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D3) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 900-2
- Zuniga S, Firrincieli D, Housset C, Chignard N. 2011. Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35: 295-302



## 7 Dansagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen Personen zu danken, die mir durch ihre Unterstützung die Anfertigung meiner Dissertation ermöglichten.

Insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Gerken, dem Direktor der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, gilt mein Dank für die Bereitstellung der Laboratorien und der finanziellen Unterstützung. Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Canbay für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die ausgezeichnete individuelle Betreuung. Seine Motivation und konstruktive Kritik haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. rer. nat. Opalka für die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation und für die Übernahme des Koreferats bedanken. Einen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Gieseler aussprechen, der sowohl mit seiner immerwährenden Unterstützung, seiner Kompetenz und Diskussionsbereitschaft zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen hat.

Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Paul, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Essen für die Bereitstellung des humanen Materials zur Zellisolation, ohne dies diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Ebenso möchte ich mich bei dem Mitarbeitern des Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen für die Messung von Serumparametern bedanken. Einen Dank geht an Frau Beste und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jochum, ohne die die VDR-SNP-Analysen nicht möglich gewesen wären. Einen lieben Dank an meine Kollegen, die sowohl durch ihre Hilfe, ihren technischen Tipps und Tricks zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Einen ganz lieben Dank geht an meine Oma, die mir, durch die Betreuung meiner Tochter, den Zeitraum gab, meine Dissertation zu schreiben. Meinen Mann Andreas danke ich für die immerwährende Unterstützung während meiner Promotionszeit. Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester für den Rückhalt, die Motivation, ihren immerwährenden Glauben an mich und ihre ständige Zuneigung aussprechen, ohne dies alles nicht möglich gewesen wäre.

## **8 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Veröffentlichungen und Auszeichnungen

- 2002      **Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfuss A, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE.** Ventricular hypertrophy plus neurohumoral activation is necessary to alter the cardiac beta-adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res.* 2002 Nov 29;91(11):1056-62.
- 2003      **Bruck H, Leineweber K, Beilfuss A, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE.** Genotype-dependent time course of lymphocyte beta 2-adrenergic receptor down-regulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 Sep;74(3):255-63.
- 2003      **Leineweber K, Klapproth S, Beilfuss A, Silber RE, Heusch G, Philipp T, Brodde OE.** Unchanged G-protein-coupled receptor kinase activity in the aging human heart. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Oct 15;42(8):1487-92.
- 2005      **Leineweber K, Rohe P, Beilfuss A, Wolf C, Sporkmann H, Bruck H, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, Brodde OE.** G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: effects of beta-adrenoceptor blockade. *Cardiovasc Res.* 2005 Jun 1;66(3):512-9. Epub 2005 Apr 7.
- 2006      **Leineweber K, Aker S, Beilfuss A, Rekasi H, Konietzka I, Martin C, Heusch G, Schulz R.** Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger with sabiporide attenuates the downregulation and uncoupling of the myocardial beta-adrenoceptor system in failing rabbit hearts. *Br J Pharmacol.* 2006 May;148(2):137-46.
- 2008      Naunyn-Schmiedeberg-Preis der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V.
- 2008      **Beilfuss A, Grandoch M, Wenzel F, Hohlfeld T, Schrör K, Weber AA.** Differential effects of factor IIa inhibitors on the endogenous thrombin potential. *Ther Drug Monit.* 2008 Dec;30(6):740-3.

## Beginn der Promotion

- 2011      **Canbay A, Seydel S, Beilfuss A, Kahraman A, Aksoy K, Gerken G, Akkiz H.** Vitamin D ameliorates stress ligand expression elicited by free fatty acids in the hepatic stellate cell line LX-2. *Turk J Gastroenterol.* 2011 Aug;22(4):400-7.

- 2011 **Wree A, Mayer A, Westphal S, Beilfuss A, Canbay A, Schick RR, Gerken G, Vaupel P.** Adipokine Expression in Brown and White Adipocytes in Response to Hypoxia. *J Endocrinol Invest.* 2012 May;35(5):522-7
- 2012 Posterpreis der 187. Tagung der RWGIM
- 2013 **Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa JP, Sydor S, Best J, Schlattjan M, Beilfuss A, Schmitt J, Hannivoort RA, Kilicarslan A, Rust C, Berr F, Tschopp O, Gerken G, Friedman SL, Geier A, Canbay A.** Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013 Apr;57(4):1394-406
- 2013 **Kahraman A, Sowa JP, Schlattjan M, Sydor S, Pronadl M, Wree A, Beilfuss A, Kilicarslan A, Altinbaş A, Bechmann LP, Syn WK, Gerken G, Canbay A.** Fetuin-A mRNA expression is elevated in NASH compared with NAFL patients. *Clin Sci (Lond).* 2013 Oct;125(8):391-400.
- 2013 **Fingas CD, Altinbas A, Schlattjan M, Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Bechmann LP, Ertle J, Akkiz H, Herzer K, Paul A, Gerken G, Baba HA, Canbay A.** Expression of apoptosis- and vitamin D pathway-related genes in hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 2013;87(3):176-81.
- 2014 **Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, Syn WK, Wedemeyer I, Mathé Z, Jochum C, Gerken G, Gieseler RK, Canbay A.** Vitamin D counteracts fibrogenic TGF- $\beta$  signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut.* 2014 Aug 18.

Essen, den 16.03.2015

**Teile der Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:**

**Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, Syn WK, Wedemeyer I, Mathé Z, Jochum C, Gerken G, Gieseler RK, Canbay A.**  
Vitamin D counteracts fibrogenic TGF- $\beta$  signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. Gut. 2014 Aug 18.

## 9 Sonstiges

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Bedeutung der Vitamin D-Vitamin D-Rezeptor-Achse in der Aktivierung der humanen hepatischen Sternzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anja Beilfuß-Zahn befürworte.

Essen, den _____	_____	_____
	Name des wissenschaftl.	Unterschrift d. wissenschaftl.
	Betreuers/Mitglieds der	Betreuers/ Mitglieds der
	Universität Duisburg-	Universität Duisburg-Essen
	Essen	

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in